

PAULO SÉRGIO MARTINS

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE
EM NEUTRÓFILOS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DE
PACIENTES SÉPTICOS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa de
pós-graduação em Infectologia.

São Paulo
2005

PAULO SÉRGIO MARTINS

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE
EM NEUTRÓFILOS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DE
PACIENTES SÉPTICOS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa de
pós-graduação em Infectologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

São Paulo
2005

Martins, Paulo Sérgio

Expressão de receptores de superfície em neutrófilos e avaliação do metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos de pacientes sépticos e sua associação com disfunção de órgãos.

/Paulo Sérgio Martins. São Paulo, 2005.
xvii, 141f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês:

Increased leukocyte oxidative metabolism in severe sepsis and septic shock correlates with organ dysfunction and mortality.

1. Sepsis 2. Choque séptico 3. Neutrófilos 4. Monócitos
5. Espécies de oxigênio reativas 6. Falência de múltiplos órgãos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

PAULO SÉRGIO MARTINS

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE
EM NEUTRÓFILOS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DE
PACIENTES SÉPTICOS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS.

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Miguel Cendoroglo Neto
Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza
Prof. Dr. Éspér Georges Kallás

SUPLENTE

Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola
Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho

Um guerreiro da luz, nunca tem pressa. O tempo trabalha a seu favor; ele aprende a dominar a impaciência, e evita gestos impensados. Andando devagar, nota a firmeza de seus passos. Um guerreiro da luz nunca colhe o fruto enquanto ele ainda está verde.

Aos meus pais pelo amor incondicional.

Agradecimentos

Ao Dr. Reinaldo Salomão com carinho! Aprendi em todos esses anos de convívio muito mais do que ciência; aprendi as noções de dignidade e perseverança. Muito obrigado meu mestre!

Dr. Blecher a cada dia, a cada ano, novas surpresas, sempre boas, sempre norteando meus passos.

Milena nada pode ser tão importante como dizer que esse trabalho é nosso!

Leandro eu também divido com você todo o prazer de ter essa monografia pronta. Espero retribuir de forma apropriada o seu empenho em me auxiliar.

Obrigado aos demais amigos do laboratório, Maria (pelo apoio além de espiritual), Antonia, Natália e Denise.

Agradeço ao Dr Éspér Kallás e ao Dr Otelo Rigato pelo exemplo a ser seguido como bom profissional em áreas distintas.

Meus queridos irmãos Neto e Luís e toda minha “sobrinhada” que fazem tudo parecer mais simples e prazeroso.

Aos meus queridos amigos João, Lucéia e Walmar que sempre estiveram muito próximos e de certa forma participaram em todo o processo de execução dessa tese.

Agradeço ao Dr. Guilherme Schettino pela forma respeitosa e carinhosa que fui recebido como membro da UTI do Hospital Sírio Libanês. Agradeço também em seu nome a todos os “companheiros” da UTI.

Agradeço toda equipe da UTI do Hospital Santa Marcelina pelo apoio e por continuarem a me fazer sentir como se lá ainda fosse parte da minha casa.

Agradeço a oportunidade de fazer parte, nesse período de tempo, da disciplina de infectologia da UNIFESP.

Enfim, obrigado a todos os amigos que não mencionei aqui, mas que estão presentes na minha vida.

Agradeço a Deus!

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Listas.....	xi
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	
1.1. Sepses.....	2
1.1.1. <i>Considerações gerais e Definições</i>	2
1.1.2. <i>Aspectos epidemiológicos</i>	5
1.1.3. <i>Fisiopatologia</i>	11
1.2. Metabolismo Oxidativo.....	25
1.3. Ativação e adaptação de neutrófilos e monócitos.....	30
1.3.1. <i>Diferenças na ativação</i>	30
1.3.2. <i>Diferenças na adaptação</i>	31
1.4. Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.....	34
2. Objetivos.....	37
3. Métodos.....	39
3.1. Voluntários sadios.....	40
3.2. Pacientes.....	40
3.2.1. <i>Critérios de inclusão</i>	40
3.2.2. <i>Critérios de exclusão</i>	40
3.3. Definições.....	41
3.4. Métodos.....	42

3.4.1. Coleta de sangue	42
3.4.2. Imunofenotipagem	43
3.4.2.1. Citometria de fluxo	44
3.4.3. Ensaio de metabolismo oxidativo	48
3.4.3.1. Citometria de fluxo	51
3.5. Medidas clínicas e laboratoriais	53
3.6. Análise estatística	54
4. Resultados.....	56
4.1. Sobre os pacientes	57
4.2. Comparação dos grupos estudados	62
4.2.1. Expressão de marcadores de superfície	62
4.2.1.1. Expressão de TLR2	62
4.2.1.2. Expressão de TLR4	64
4.2.1.3. Expressão de CD11b	66
4.2.1.4. Expressão de CD11c	68
4.2.1.5. Expressão de CD66b	70
4.2.2. Metabolismo oxidativo	73
4.2.2.1. Metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos	73
4.2.2.2. Metabolismo oxidativo de neutrófilos	73
4.2.2.3. Metabolismo oxidativo de monócitos	79
4.2.3. Correlação entre receptores de superfície e metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos	83
4.2.4. Correlação entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos	84
4.3. Análise de disfunção de órgãos	90

4.3.1. Associação entre marcadores de superfície e SOFA	92
4.3.2. Associação entre metabolismo oxidativo e SOFA	92
4.3.4. Análise entre sepse, SOFA<7 e SOFA ≥ 7	95
5. Discussão.....	96
6. Conclusões.....	113
7. Referências bibliográficas.....	115
8. Anexos.....	136

Lista de Figuras

Figura 1. Relação entre TLRs e sinalização	20
Figura 2. Migração e marginalização de neutrófilos	24
Figura 3. Formação de ERO	29
Figura 4. Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total	46
Figura 5. Estratégia de análise de monócitos e neutrófilos em sangue total	47
Figura 6. Formação de DCF a partir de DCFH-DA	49
Figura 7. Histogramas representando produção e ERO	52
Figura 8. Expressão de TLR2 em neutrófilos	63
Figura 9. Expressão de TLR4 em neutrófilos	65
Figura 10. Expressão de CD11b em neutrófilos	67
Figura 11. Expressão de CD11c em neutrófilos	69
Figura 12. Expressão de Cd66b em neutrófilos	71
Figura 13. Expressão de CD66b em neutrófilos por estadios da sepse	72
Figura 14. Metabolismo oxidativo de neutrófilos	75
Figura 15. Metabolismo oxidativo de neutrófilos por estadios da sepse	78
Figura 16. Metabolismo oxidativo de monócitos	80
Figura 17. Metabolismo oxidativo de monócitos por estadios da sepse	82
Figura 18. Correlações entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos	87

Figura 19. Correlações entre metabolismo oxidativo e SOFA	94
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Definições de SRIS, sepse, sepse grave e choque séptico	3
Tabela 2. Critérios diagnósticos de sepse.	4
Tabela 3. Relação de anticorpos empregados na imunofenotipagem	43
Tabela 4. Painel de anticorpos	44
Tabela 5. Ensaio de metabolismo oxidativo	50
Tabela 6. SOFA	54
Tabela 7. Informações clínicas dos pacientes	59
Tabela 8. Expressão de TLR2 em neutrófilos	63
Tabela 9. Expressão de TLR4 em neutrófilos	65
Tabela 10. Expressão de CD11b em neutrófilos	67
Tabela 11. Expressão de CD11c em neutrófilos	69
Tabela 12. Expressão de CD66b em neutrófilos	71
Tabela 13. Expressão de CD66b em neutrófilos por estadios da sepse	72
Tabela 14. Metabolismo oxidativo de neutrófilos	75
Tabela 15. Metabolismo oxidativo de neutrófilos por estadios da sepse	78
Tabela 16. Metabolismo oxidativo de monócitos	80
Tabela 17. Metabolismo oxidativo de monócitos por estadios da sepse	82

Tabela 18. Metabolismo oxidativo e SOFA	93
Tabela 19. Metabolismo oxidativo em sepse, SOFA<7 e SOFA≥7	96

Lista de Quadros

Quadro 1. Correlações entre marcadores de ativação de superfície e metabolismo oxidativo	84
Quadro 2. Correlações entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos	86
Quadro 3. Curva ROC do SOFA	91

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ACCP/SCCM – American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine

ATP - adenosina trifosfato

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

CDC – centers for disease control

CID – classificação internacional de doenças

CLP – ligadura e punção de ceco

DMOS – disfunção de múltiplos órgãos e sistemas

ERO – espécies reativas de oxigênio

FiO₂ – fração inspirada de oxigênio

fMLP - N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine

GM-CSF - granulocyte macrophage-colony stimulating factor

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

IC – intervalo de confiança

I κ B - Inhibitor of NF- κ B kinase

IFN- β – Interferon

IL1-ra - IL-1 recetor antagonist

IRAKs - IL-1 receptor-associated kinases IFN-g – interferon gama

IRF3 – interferon regulatory factor 3

JNK – Jun N-terminal kinase

LBP - lipopolysaccharide-binding protein

mRNA – RNA mensageiro

mCD14 – CD14 ligado à membrana

MAP quinases – mitogen-activated protein kinases

MGIF – média geométrica da intensidade de fluorescência

MyD88 - myeloid differentiation factor 88

NADPH-oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NO- - óxido nítrico

NOD2 - nucleotide-binding oligomerization domain

O₂⁻ - ânion superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

¹O₂ - oxigênio “*singlet*”

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PaO₂ – pressão arterial de oxigênio

PECAM - platelet endothelial cell adhesion molecule

PGRP-S - peptidoglycan recognition protein-S

PHA – fitohemaglutinina

PMA – formol miristato acetato

PMAPs - padrões moleculares associados a patógenos

RNA – ácido ribonucleico

RNI – razão normalizada internaionalmente

RR – risco relativo

RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão

sCD14 – CD14 solúvel

SOD - superóxido dismutase

SRIS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SVO₂ – saturação venosa de oxigênio

TBK1 – TRAF-family-member-associated NF-κB activator-binding kinase 2

TIR - Toll-interleukin-1 resistance

TIRAP - TIR adapter protein

TLR – Toll-like receptor

TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada

TRAF6 - Tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6

TRAM - TRIF-related adapter molecule

TREM-1 - triggering receptor expressed on myeloid cells

TRIF - domain-containing adapter inducing interferon-β

UTI – unidade de terapia intensiva

• ABREVIATURAS

ACCP/SCCM – American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine

ATP - adenosina trifosfato

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

CDC – centers for disease control

CID – classificação internacional de doenças

CLP – ligadura e punção de ceco

DMOS – disfunção de múltiplos órgãos e sistemas

ERO – espécies reativas de oxigênio

FiO₂ – fração inspirada de oxigênio

fMLP - N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine

GM-CSF - granulocyte macrophage-colony stimulating factor

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

IC – intervalo de confiança

I κ B - Inhibitor of NF- κ B kinase

IFN- – Interferon

IL1-ra - IL-1 recetor antagonist

IRAKs - IL-1 receptor-associated kinases IFN-g – interferon gama

IRF3 – interferon regulatory factor 3

JNK – Jun N-terminal quinase

LBP - lipopolysaccharide-binding protein

mRNA – RNA mensageiro

mCD14 – CD14 ligado à membrana

MAP quinases – mitogen-activated protein kinases

MGIF – média geométrica da intensidade de fluorescência

MyD88 - myeloid differentiation factor 88

NADPH-oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NO- - óxido nítrico

NOD2 - nucleotide-binding oligomerization domain

O₂⁻ - ânion superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

¹O₂ - oxigênio “*singlet*”

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PaO₂ – pressão arterial de oxigênio

PECAM - platelet endothelial cell adhesion molecule

PGRP-S - peptidoglycan recognition protein-S

PHA – fitohemaglutinina

PMA – formol miristato acetato

PMAPs - padrões moleculares associados a patógenos

RNA – ácido ribonucléico

RNI – razão normalizada internaionalmente

RR – risco relativo

RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão

sCD14 – CD14 solúvel

SOD - superóxido dismutase

SRIS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SVO₂ – saturação venosa de oxigênio

TBK1 – TRAF-family-member-associated NF-κB activator-binding kinase 2

TIR - Toll-interleukin-1 resistance

TIRAP - TIR adapter protein

TLR – Toll-like receptor

TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada

TRAF6 - Tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6

TRAM - TRIF-related adapter molecule

TREM-1 - triggering receptor expressed on myeloid cells

TRIF - domain-containing adapter inducing interferon-β

UTI – unidade de terapia intensiva

Resumo

A sepse apresenta crescente incidência e elevada morbidade e mortalidade, sendo a principal causa de óbito nas unidades de terapia intensiva. O controle da infecção depende do adequado reconhecimento dos microrganismos pelas células do hospedeiro e de resposta efetora competente. Paradoxalmente, na sepse, os mecanismos de proteção estão também envolvidos no processo de doença, sendo o limite entre resposta protetora e de lesão ainda impreciso.

Objetivos: Avaliar o estado de ativação dos neutrófilos no continuum da sepse através da expressão de receptores de superfície e do metabolismo oxidativo; avaliar o estado de ativação de monócitos pelo metabolismo oxidativo; avaliar a associação do estado de ativação com disfunção orgânica. **Métodos:** Foram incluídos 41 pacientes sendo 14 em sepse, 12 em sepse grave e 15 em choque séptico, classificados de acordo com o consenso de 1992. Também foram incluídos 17 voluntários saudáveis (grupo controle). Por citometria de fluxo, foram estudadas a expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b, CD11c e CD66b na superfície de neutrófilos em sangue total, e foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos e monócitos através da oxidação de DCFH em sangue total. Disfunção orgânica foi mensurada pelo SOFA.

Resultados: Houve diminuição da expressão de TLR2 ($p=0,05$) e tendência a diminuição de TLR4 (0,06) no grupo de choque séptico em relação aos indivíduos saudáveis. Não houve diferença na expressão de CD11b e CD11c. Houve aumento da expressão de CD66b no conjunto de pacientes em relação ao grupo controle ($p=0,01$). O metabolismo oxidativo de neutrófilos foi maior no conjunto de pacientes em relação ao grupo controle na condição basal e após estímulos com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus* ($p<0,001$ em todas as condições). O metabolismo oxidativo de monócitos também foi significativamente menor no conjunto de pacientes em todas as condições testadas ($p<0,01$). O metabolismo oxidativo em neutrófilos na sepse grave foi maior que o grupo controle em todas as condições, entretanto foi menor que o grupo de sepse após estímulo com PMA ($p=0,04$) e menor que o grupo de choque séptico após LPS ($p=0,02$) e *S. aureus* ($p=0,04$). O mesmo foi observado no metabolismo de monócitos na sepse grave em relação ao grupo de sepse após LPS ($p=0,01$) e ao grupo de choque séptico em relação a fMLP ($p=0,03$) e LPS ($p=0,008$). Houve correlação forte entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos SOFA foi capaz de discriminar entre sobreviventes e não sobreviventes com curva ROC de 0,78 ($p=0,02$). Houve correlação entre disfunção de órgãos e metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos nos grupos de sepse grave e choque séptico, embora o metabolismo oxidativo tenha sido maior no grupo de choque séptico. O metabolismo oxidativo do grupo de sepse esteve igualmente aumentado em relação ao grupo de choque séptico, porém o primeiro não desenvolve disfunção orgânica. **Conclusões:** Observou-se maior estado de ativação de neutrófilos e monócitos na sepse avaliados pelo maior metabolismo oxidativo. Todavia, nas fases iniciais da sepse a produção elevada de espécies reativas de oxigênio está relacionada a uma resposta efetiva para resolução do processo infeccioso e em fases mais avançadas parece estar relacionada a maior dano tecidual com conseqüente aumento do número de disfunções e morte. Dessa forma, a produção de espécies reativas de oxigênio no continuum da sepse deve ser interpretada à luz da observação clínica.

Abstract

Sepsis is the leading cause of mortality in Intensive Care Unit. Sepsis morbidity and mortality are increasing through years. Infection control depends on adequate microbes recognition and satisfactory cell activation. Paradoxically it has been seen that in sepsis cell activation can be both good and harmful to the host. **Objectives:** To evaluate neutrophil activation in the continuum of sepsis measuring cell surface receptors and oxidative metabolism; to evaluate monocyte activation measuring oxidative metabolism; to evaluate the correlation between cell activation and organ dysfunction. **Methods:** Regarding the 1992 ACCP/SCCM consensus, 41 patients were included: 14 with sepsis, 12 with severe sepsis and 15 with septic shock. 17 healthy volunteers were included as control group. TLR2, TLR4, CD11b, CD11c and CD66b expression on neutrophil surface using whole blood were measured using flow cytometry. Reactive oxygen species formation due to DCFH oxidation was also measured by flow cytometry. Organ dysfunction was characterized and measured using SOFA score. **Results:** It was observed diminished TLR2 and TLR4 expression in septic shock compared to healthy volunteers ($p=0.05$ and $p=0.06$, respectively). There were no differences found in CD11b and CD11c expression. CD66b expression was increased comparing the whole group of patients and the control group ($p=0.01$). Neutrophil oxidative burst has been increased in the whole group of patients compared to the control group at baseline and under PMA, fMLP, LPS and *S. aureus* stimulation ($p<0.001$ for all conditions tested). Monocyte oxidative metabolism was also significantly increased in the whole patient group compared to the control group in all conditions tested ($p<0,01$). Neutrophil and monocyte oxidative metabolism due to PMA, LPS and *S.aureus* stimulation in severe sepsis have been diminished compared to sepsis and septic shock. A strong correlation was observed between neutrophil and monocyte oxidative metabolism. SOFA score discriminated patients between survivors and non survivors (ROC curve was 0.78; $p=0.02$). It has been observed positive correlation between organ dysfunction and oxidative metabolism in neutrophils and monocytes considering severe sepsis and septic shock. However, despite oxidative burst in sepsis has been as high as in septic shock, no organ dysfunction was found in sepsis. **Conclusions:** Neutrophils and monocytes are activated in the continuum of sepsis considering reactive oxygen species formation. Nonetheless, in the onset of sepsis increased oxidative metabolism was probably involved in resolution of the infectious course, but on late stages of sepsis it was associated with tissue damage and consequently organ dysfunction and death.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. SEPSE

1.1.1. Considerações gerais e definições

Sepse pode ser definida como a resposta inflamatória sistêmica frente à infecção, denotando um processo progressivo de injúria tecidual, onde a disfunção orgânica múltipla representa sua expressão mais grave, conforme postulado por Bone e colaboradores no consenso de sepsis de 1992 (BONE, SIBBALD et al., 1992). A importância em se padronizar essas definições vinha de encontro ao crescente interesse pelo entendimento da fisiopatologia dessa síndrome cada vez mais incidente. Entretanto, a sepsis é composta por uma constelação de sinais e sintomas, o que dificulta, além da compreensão da patogênese, também o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

Foi sendo observado com o passar dos anos a necessidade em se rever e atualizar as definições de 1992. Assim, em 2001, em nova reunião de estudiosos (LEVY, FINK et al., 2003), foram atribuídos aspectos mais clínicos às definições anteriores, levando em consideração, entre outros fatores, o fato de que muitos pacientes com sepsis não têm foco infeccioso documentado (PITTET, THIEVENT et al., 1996). Houve então uma atualização das definições para resposta inflamatória sistêmica, sepsis, sepsis grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos (Tabela 1), tendo sido

mantida a idéia de estratificação e de continuidade da mesma doença, e os critérios diagnósticos foram ampliados conforme apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Definições de SRIS, sepse, sepse grave e choque séptico.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica: Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves, como grandes queimados e pancreatite, que ocorre, necessariamente, na ausência de infecção. Há perspectiva de futuramente utilizar-se apenas critérios bioquímicos e imunológicos e não mais critérios clínicos para identificar a SRIS

Infecção: Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória reacional à presença de microorganismos ou à invasão de tecidos, fluidos ou cavidade corpórea.

Sepse: É a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica decorrente de infecção, mesmo que o foco infeccioso seja apenas suspeitado. A tabela 2 mostra os critérios diagnósticos de sepse.

Sepse Grave: Sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. Hipoperfusão e anormalidades da perfusão pode incluir, mas não estão limitadas a acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental, entre outras. A sepse grave é considerada atualmente a doença com maior mortalidade em pacientes sem doença coronariana nos EUA.

Choque Séptico: Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial não explicada porquanto não infecciosa, sendo hipotensão definida como PA sistólica < 90 mmHg ou redução de > 40 mmHg da linha de base, ou PAM < 60, a despeito de adequada reposição volêmica, na ausência de outras causas de hipotensão..

SRIS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

Tabela 2. Critérios diagnósticos de sepse.

Infecção documentada ou suspeitada e algum dos critérios que se seguem:

Variáveis gerais:

Temperatura retal > 38,3°C ou < 36°C

1.1.2. Aspectos epidemiológicos

No início da década de 90 já se tinha comprovação de que a incidência de sepse vinha aumentando nos Estados Unidos. Um estudo abrangente conduzido pelo CDC mostrou que em 1989, a incidência de sepse era de 175,9 por 100.000 habitantes contra 73,6 por 100.000 habitantes em 1979 (1990). Talvez a limitação desse estudo esteja no fato de que na época ainda não se havia postulado as definições de sepse adotadas a partir de 1992.

Seguiram-se então estudos epidemiológicos norte-americanos de SRIS e sepse utilizando as definições do ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*) de 1992. Dois grandes estudos merecem destaque. No primeiro deles, RANGEL-FRAUSTO e colaboradores (RANGEL-FRAUSTO, PITTET et al., 1995) estudaram 3708 pacientes admitidos em três Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e três enfermarias. 68% dos pacientes (2527) apresentaram SRIS, sendo que entre estes, 26%, 18% e 4% desenvolveram, respectivamente, sepse, sepse grave e choque séptico. Pacientes com choque séptico apresentaram um maior número de órgãos com disfunções. A limitação desse estudo deveu-se principalmente ao fato de não ter sido considerada a incidência, mas sim a ocorrência de sepse. O segundo estudo, conduzido por Sands e colaboradores (SANDS, BATES et al., 1997), incluiu 8 centros médicos acadêmicos. O estudo foi desenvolvido prospectivamente entre os anos de 1993 e 1994. Foram incluídos pacientes internados em UTIs e todos os pacientes de enfermaria e de pronto socorro que tiveram hemocultura positiva, perfazendo 12.759 pacientes. A taxa de ocorrência encontrada de

sepse foi de $2,0 \pm 0,16$ casos por 100 admissões ou $2,8 \pm 0,17$ por 1000 pacientes/dia.

Existem vários estudos epidemiológicos de sepse também no continente europeu datando essa mesma época onde foram utilizados critérios semelhantes àqueles utilizados pelos norte-americanos. No *Italian SEPSIS study* de Salvo e colaboradores (SALVO, DE CIAN et al., 1995) foram considerados 1101 pacientes, sendo a SRIS o critério de inclusão no momento da admissão dos pacientes. A taxa de mortalidade em pacientes com SRIS foi de 26,5%, semelhante à encontrada em pacientes críticos sem SRIS ou infecção. Entretanto, a mortalidade foi maior em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico, sendo de 36%, 52% e 81,8%,

de mortalidade global dos pacientes com sepse grave documentada ou com choque séptico foi de 56%. Os autores relataram ainda que os fatores de risco para o desenvolvimento de sepse grave foram idade avançada, admissões clínicas ou cirúrgicas de urgência, imunossupressão ou insuficiência hepática crônica. Achados microbiológicos e terapia antimicrobiana tiveram pouca influência sobre o prognóstico. Sepse urinária esteve associada ao melhor resultado.

A análise desses estudos também mostrou que pacientes internados em UTI desenvolvem cerca de um quarto das infecções nosocomiais, com prevalência variando de 15 a 40%. Pneumonia e outras infecções do trato respiratório são os principais focos encontrados em pacientes internados em UTI, respondendo por metade das infecções. O trato urinário responde por 10 a 20%. Outros focos como ferida operatória, infecções do trato digestivo e do sistema nervoso central, correspondem a um quarto das infecções (VINCENT, BIHARI et al., 1995).

Em nosso meio, estudos epidemiológicos também ressaltam a importante incidência de sepse. Em estudo de SALOMÃO e colaboradores (SALOMAO, WEY et al., 1992) considerando aspectos epidemiológicos de pacientes que apresentaram bacteremia, em hospital universitário (Hospital São Paulo) entre 1985 e 1986, foi encontrada uma incidência de 21,7 bacteremias a cada 1000 admissões. Ressalta-se que essa incidência alta esteve relacionada às características dos pacientes admitidos, sendo ainda maior nos extremos de idade. O sítio de infecção mais encontrado foi o trato respiratório, seguindo-se infecções gastrintestinais e urinária. Em 1993, Salomão e colaboradores (SALOMAO, CASTELO FILHO et al., 1993)

publicaram que a mortalidade nesses pacientes foi de 33,4%, seis vezes maior que aquela encontrada em pacientes que não apresentaram bacteremia. A idade acima de 40 anos, a presença de doença preexistente, infecções respiratórias, presença de choque e isolamento de *Pseudomonas sp*, estiveram significativamente associados à mortalidade. Além disso, a terapia antimicrobiana adequada, reduziu a incidência de choque e melhorou a sobrevida nos pacientes que apresentaram bacteremia.

Outro estudo também em nosso meio avaliando todos os pacientes que apresentaram hemocultura positiva admitidos no Hospital São Paulo, entre 1992 e 1993, observou mortalidade de 33% entre os que apresentaram bacteremia, 36% na sepse, 72% na sepse grave e 78% no choque séptico (UJVARI, CASTELO FILHO et al., 1996). Nesse mesmo período, a literatura colocava que as taxas de mortalidade variavam de 10 a 80% dependendo do tipo de UTI e da definição de sepse utilizada (BRUN-BUISSON, DOYON et al., 1996) e os fatores de risco para o desenvolvimento da sepse e do choque séptico eram bem reconhecidos e eram, em parte, responsáveis pelo aumento da prevalência. Os principais seriam: aumento progressivo da sobrevida de pacientes com doenças crônico-degenerativas e imunossupressoras, utilização de procedimentos invasivos e os próprios avanços tecnológicos, que possibilitariam a manutenção do suporte orgânico para vítimas de insultos agudos graves (SHEAGREN, S. L. In: Wingaarden JB, Bennet JC., 1992).

Há um interessante estudo prospectivo de KNAUS e colaboradores (KNAUS, SUN et al., 1992) utilizando pacientes sépticos admitidos em UTI que mostra que 18% desses pacientes não preenchiam critérios de sepse no

momento da admissão, porém o fizeram ainda na primeira semana na UTI. Com isso podemos entender que é possível que tenha havido uma subestimativa da real incidência de sepse até então. Segundo o *Centers for Disease Control* (CDC), em 1990 havia 450.000 casos de sepse por ano nos Estados Unidos com mais de 100.000 mortes (CDC 1990). Entretanto, dados de Linde-Zwirble e colaboradores (LINDE-ZWIRBLE e ANGUS, 2004), utilizando a classificação internacional de doenças número 9 (CID-9), sugerem que o número total de casos era significativamente maior do que previamente estimado.

Mais recentemente, Alberti e colaboradores (ALBERTI, BRUN-BUISSON et al., 2002) publicaram um elegante estudo epidemiológico englobando 28 unidades de terapia intensiva da Europa. Os autores avaliaram 14.364 pacientes admitidos em um ano. Do número total de pacientes avaliados, 6.011 permaneceram menos de 24 horas na UTI e não foram avaliados plenamente ao longo do estudo. O principal achado desse estudo foi que a incidência de infecção foi de 21,1%, e, nos pacientes que permaneceram na UTI por mais de 24 horas, a incidência foi de 18,9%, incluindo 45% dos pacientes infectados já na admissão. 6,6% do total de pacientes preencheram os critérios de sepse grave e 8,2% de choque séptico. A taxa de mortalidade hospitalar variou de 16,9% nos pacientes não-infectados a 53,6% naqueles com infecção adquirida no hospital. A taxa de mortalidade hospitalar dos pacientes com sepse ficou entre 44,8 e 67,9% e dos pacientes com choque séptico entre 47,2 e 63,8%.

A crescente incidência de sepse e sua elevada mortalidade foram subsídio para a realização de estudos de base populacional. O estudo

relevante de Angus e colaboradores publicado em 2001 (ANGUS e WAX, 2001) foi baseado em análise retrospectiva de 6.621.559 admissões hospitalares em 7 estados americanos (aproximadamente 25% da população). Os autores utilizaram a classificação do CID-9 para identificar pacientes com sepse e disfunção orgânica, verificando, *a posteriori*, se os mesmos pacientes preenchiam os critérios da ACCP/SCCM de 1992. Nessa amostra populacional, os autores identificaram 192.980 casos de sepse grave durante o ano de 1995. Após ajustes para idade e sexo, poder-se-ia afirmar que a incidência anual de sepse grave naquele país é de 3,0 casos por 1000 habitantes ou 2,6 casos por 100 altas hospitalares. Vale ressaltar que estão englobados adultos e crianças. Outro dado interessante desse estudo é que cerca de 55% dos pacientes com sepse grave apresentavam alguma comorbidade. Metade dos pacientes com sepse grave identificados recebeu, em algum momento de sua hospitalização, cuidados intensivos. A taxa de mortalidade global foi de 28,6% o que resulta em mais de 175.000 mortes anualmente, e os custos relacionados ao tratamento da sepse situam-se em torno de 16,7 bilhões de dólares ao ano. Ainda, assumindo um crescimento anual de casos por ano de 1,5%, há estimativa, naquele país, de 934.000 novos casos em 2010 e de 1.110.000 no ano de 2020.

No Brasil, apesar de não existirem ainda estimativas precisas, a elevada incidência de sepse pode ser observada em um estudo epidemiológico denominado estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*). A incidência de sepse grave e choque séptico nos centros considerados situam-se em 27% e 23%, respectivamente e a taxa de mortalidade global foi de 22% (SILVA, PEDRO M DE et al., 2004)

Assim, de forma até mesmo intuitiva, podemos assumir que a incidência de sepse vem aumentando e a sua epidemiologia mudando no decorrer dos anos. Por exemplo, o número de pacientes admitidos em UTIs tem sido cada vez maior, bem como a utilização de novos recursos nessas unidades o que, por sua vez, acarreta em aumento dos fatores predisponentes a infecções, e assim por diante.

Todos estes aspectos epidemiológicos ressaltam a importância em se conhecer melhor a fisiopatologia da sepse para que se possam desenvolver novas estratégias terapêuticas (LOWRY, 1994; SALOMAO, RIGATO et al., 1999; WHEELER e BERNARD, 1999).

1.1.3. Fisiopatologia

A fisiopatologia da sepse está relacionada a uma interação complexa entre o hospedeiro e o microorganismo infectante. São vários os processos envolvidos, sendo o principal relacionado à ativação de células inflamatórias tais como os leucócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas e eosinófilos. A ativação de células inflamatórias, por sua vez, vai desencadear ativação pertinente do endotélio, do sistema imune, de citocinas pró e antiinflamatórias, e do sistema de coagulação.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções e é ativado quando um patógeno atravessa a barreira natural do hospedeiro. Utiliza-se de uma variedade de receptores de reconhecimento que podem estar expressos na superfície celular, nos compartimentos intracelulares ou

mesmo como substâncias secretadas na corrente sanguínea ou em fluidos teciduais (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). Dentre as células efetoras do sistema imune inato, as mais importantes são os neutrófilos e macrófagos, capazes de fagocitar e digerir os patógenos, secretar citocinas e quimiocinas, além de coordenar mecanismos adicionais de resposta do hospedeiro. O fato de expor os neutrófilos a bactérias ou produtos bacterianos, ativa essas células como parte da resposta inflamatória, obtendo como resultado final o clareamento do patógeno.

- **Receptores do sistema imune inato**

O papel das células do sistema imune inato é primariamente reconhecer e discriminar potenciais patógenos de si próprio. Para tanto, fagócitos reconhecem determinados padrões microbianos por meio de um número restrito de receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP). E embora vários RRP envolvidos em opsonização, ativação de complemento e fagocitose tenham sido descritos anteriormente, há pouco tempo os receptores envolvidos na indução de genes inflamatórios, os receptores Toll-like (TLRs ou Toll-like receptors da sigla em inglês que adotaremos aqui) foram identificados (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT et al., 1997).

O primeiro receptor da família Toll foi identificado em *Drosophila* como componente de via de sinalização que controla a polaridade dorso-ventral em embriões, e, além disso, com importante participação na resposta imune de

moscas adultas, o que pode ser demonstrado pelo fato de moscas com mutação que lhes confira perda da função do gene Toll, tornaram-se altamente suscetíveis a infecções fúngicas (LEMAITRE, NICOLAS et al., 1996). Atualmente, onze homólogos humanos dos TLRs já estão identificados e se não todos, a maioria envolvida no reconhecimento dos principais padrões microbianos, também conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) (HOPKINS e SRISKANDAN, 2005; MEDZHITOV, 2001).

A identificação dos agonistas específicos dos TLRs não é fácil. TLR1, -2, -4, -5 e -6 são expressos na superfície celular onde são especializados no reconhecimento de produtos bacterianos, incluindo lipoproteínas de bactérias e ácidos lipoteicóicos (TLR2 como heterodímero com TLR1 ou TLR6), LPS (TLR4), ou flagelinas (TLR5) (TAKEDA e AKIRA, 2004). Nas células fagocíticas, há evidência de que esses receptores também são recrutados ao fagossomo através de ligação íntima (UNDERHILL, OZINSKY et al., 1999) (NOMURA, AKASHI et al., 2000). Já o TLR3, -7, -8 e -9, são localizados em compartimentos intracelulares (AHMAD-NEJAD, HACKER et al., 2002) e são especializados na detecção de vírus ou no reconhecimento de ácidos nucleicos tais como DNA de duplo filamento (TLR3), RNA viral monofilamento (TLR7) ou DNA não-metilado de bactérias e vírus (TLR9) (TAKEDA e AKIRA, 2004).

A noção de associação “monogâmica” entre um TLR em particular e seu receptor microbiano, como no caso do TLR4 e LPS, é na realidade uma simplificação. O TLR2, por exemplo, pode ser ativado por componentes da parede celular de fungos e micobactérias. Essa maior complexidade vem do

fato de que os TLRs parecem ser capazes de se combinarem para formar um repertório capaz de distinguir intimamente os seus ligantes (OZINSKY, UNDERHILL et al., 2000) e há evidência de que o polimorfismo de proteínas dos TLRs pode explicar em parte a grande variabilidade de respostas individuais aos estímulos infecciosos (LORENZ, MIRA et al., 2000).

Os neutrófilos humanos, por exemplo, expressam mRNA para todos os TLRs, exceto o TLR3, e todos os TLRs expressos induzem uma resposta inflamatória em neutrófilos quiescentes (HAYASHI, MEANS et al., 2003), exceto pela CpG que requer pré-tratamento com fator estimulador de crescimento de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) para permitir respostas adequadas (HAYASHI, MEANS, et al., 2003; NEUFERT, PAI et al., 2001). Além disso, o DNA bacteriano pode ativar neutrófilos de uma maneira que independe de TLR9 e CpG, através de um mecanismo ainda a ser identificado (TREVANI, CHORNY et al., 2003). Além disso, existem co-receptores na membrana celular que podem influenciar a sinalização. Os neutrófilos, por modelo, apresentam níveis constitutivos altos de integrina CD11b/CD18 (SABROE, JONES et al., 2002), que por sua vez, contribuem na sinalização do TLR4 em células monocíticas (PERERA, MAYADAS et al., 2001). Ainda, a sinalização também é facilitada nos neutrófilos, bem como em outras células, pelos “lipid rafts” (FESSLER, ARNDT et al., 2004).

Fica claro então que o evento inicial que desencadeia a resposta imune inata frente a um patógeno invasor está diretamente relacionado ao reconhecimento deste. Para que isso que ocorra, os RRs de células do sistema imune inato vão interagir com as PAMPs.

O LPS é um bom exemplo dessas PMAPs, além de ser um dos agonistas bacterianos mais potentes já conhecidos (KNAPP e VAN DER POLL, J.-L. Vincent, 2004; KNAPP, DE VOS et al., 2003), tem um papel dominante na sobrevivência de bactérias gram negativas. A membrana externa dessas bactérias é constituída por uma camada lipídica dupla, separada da membrana citoplasmática por peptidoglicanos. O LPS fica fixo nessa membrana externa através da porção denominada lipídeo A (GALANOS, FREUDENBERG et al., 1979). E até que a proteína ligadora de LPS, a LBP (do inglês lipopolysaccharide-binding protein) fosse descrita, acreditava-se que o LPS poderia ativar células imunes através de mecanismo não específico envolvendo intercalação espontânea do lipídeo A na camada lipídica dupla. Foi então demonstrado que a ativação de células do hospedeiro dependia da presença de LBP (TOBIAS, SOLDAU et al., 1986) e do receptor CD14 (WRIGHT, RAMOS et al., 1990).

A LBP é uma proteína de fase aguda produzida no fígado e pulmões (SCHUMANN, KIRSCHNING et al., 1996). A importância biológica da LBP e do receptor CD14 pode ser ilustrada em camundongos com deficiência genética de LBP ou CD14. Eles apresentam refratariedade ao choque induzido por endotoxinas (HAZIOT, FERRERO et al., 1996; JACK, FAN et al., 1997), porém são altamente suscetíveis a infecções por bactérias gram negativas como peritonite por *Salmonella* (BERNHEIDEN, HEINRICH et al., 2001) ou *Escherichia coli* (KNAPP, DE VOS, et al., 2003). Além disso, há evidência que a LBP também esteja envolvida na resposta imune a bactérias gram positivas, já que níveis altos de LBP e de CD14 solúvel têm sido descritos em sepse por essas bactérias (BLAIRON, WITTEBOLE et al.,

2003). Entretanto, não há evidência de que o receptor CD14 seja imprescindível na resposta imune a bactérias gram positivas *in vivo* (WEBER, FREYER et al., 2003).

O CD14 tem duas formas de apresentação, ligado à membrana (mCD14) ou solúvel no plasma (sCD14). O mCD14 participa claramente na indução da resposta inflamatória, tanto que a administração de anticorpo recombinante anti CD14 atenua os sintomas clínicos e reduz consideravelmente a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos humanos de endotoxemia (VERBON, DEKKERS et al., 2001). O sCD14 também está relacionado à ativação de células inflamatórias e níveis aumentados estão associados a maior mortalidade em choque séptico por gram negativo (LANDMANN, ZIMMERLI et al., 1995). Entretanto, Kitchens et al. estudando monócitos de pacientes sépticos, descreve que o sCD14 pode aumentar a transferência de LPS ligado a células para lipoproteínas o que, por sua vez, contribuiria para a neutralização do LPS com conseqüente diminuição da resposta do LPS nesses monócitos (KITCHENS, THOMPSON et al., 2001). Vale ressaltar um estudo recente sobre o papel do CD14 na sinalização do LPS que coloca que a forma R (de “rough”) do LPS, diferente da forma S (de “smooth”), pode induzir ativação celular independente do CD14 (JIANG, GEORGEL et al., 2005).

Ainda no que diz respeito à sinalização, a descoberta da MD-2 também contribuiu para fundamentar a importância do TLR4 nesse processo. A MD-2 é uma proteína que se liga ao TLR4 no complexo de Golgi e é secretada como molécula solúvel por células que expressam MD-2 (VISINTIN,

MAZZONI et al., 2001). O seu papel parece ser de posicionar o TLR4 corretamente na superfície celular (NAGAI, AKASHI et al., 2002).

Em suma, a interação celular com LPS envolve a LBP como carreador de CD14 na membrana celular, que vai então formar um complexo com o TLR4. É uma vez que o LPS se liga ao complexo TLR4/MD-2, o mecanismo pelo qual o receptor é ativado não é claro. Latz e colaboradores (LATZ, VISINTIN et al., 2002) sugerem que a agregação ao TLR4, artificialmente utilizando mAbs, ou como resultado de ligação ao LPS, é suficiente para ativar a transdução do sinal. O próximo passo nesse processo de sinalização demanda o recrutamento de moléculas de adaptação denominadas TIR (do inglês Toll-interleukin-1 resistance). Cada TLR tem um domínio extracelular que contém múltiplas repetições de leucina e um domínio TIR. São conhecidas quatro moléculas de adaptação do domínio TIR capazes de mediar a sinalização do TLR4. Todas compartilham uma sequência significativa de aminoácidos similares. São elas a MyD88 (myeloid differentiation factor 88), a TIRAP (TIR adapter protein), a TRIF (domain-containing adapter inducing interferon- β) e a TRAM (TRIF-related adapter molecule). Atualmente está claro que a MyD88 e TRIF promovem uma plataforma central para a propagação de sinais complexos dos TLRs via associação direta com quinases e fatores de transcrição (HONDA, YANAI et al., 2004; YAMAMOTO, SATO et al., 2003). Todos os TLRs caracterizados, à exceção do TLR3, sinalizam com a utilização da MyD88. Na ativação do receptor, a MyD88 é recrutada via seu próprio domínio TIR que vai então interagir com o domínio TIR do TLR em questão. Isso favorece o recrutamento e ativação da família de quinases conhecida como IRAKs (IL-1

receptor-associated kinases) 1, 2 e 4. A IRAK 4 é recrutada primeiramente, torna-se ativa e fosforila a IRAK 1 (AKIRA e TAKEDA, 2004). Estas quinases interagem com a MyD88 através do domínio de morte comum a ambas as proteínas, promovendo então a ativação da TRAF6 (Tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6). Isso vai ativar quinases situadas na seqüência do processo de sinalização, incluindo as I κ B (Inhibitor of NF- κ B kinase) resultando na liberação de NF- κ B que se transloca para o núcleo e vai aumentar a expressão gênica de citocinas inflamatórias determinando, por fim, uma resposta pró-inflamatória. E dependendo de qual molécula de adaptação esteja envolvida, o processo de resposta dos TLRs pode ser dividido em duas categorias: de resposta precoce dependente de MyD88 onde estão envolvidos MyD88 e TIRAP, vitais para a ativação de NF- κ B pelo TLR2 e TLR4, e de resposta tardia que independe de MyD88 e tem envolvimento de TRAM e TRIF, sendo este utilizado pelo TLR3 na indução da síntese de IFN- γ (SATO, SUGIYAMA et al., 2003).

Existem várias outras vias adicionais de sinalização. Entre elas podemos citar a PGRP-S (peptidoglycan recognition protein-S), a TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells) e a NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain). A PGRP-S é capaz de reconhecer o peptidoglicano da parede bacteriana e ativar dois mecanismos de defesa antimicrobianos. A TREM-1 que pertence à superfamília das imunoglobulinas, ativa neutrófilos e monócitos sinalizando através da proteína de adaptação DAP12 (BOUCHON, DIETRICH et al., 2000). Ela amplifica a resposta iniciada pelo TLR contra a invasão microbiana e potencializa a secreção de quimiocinas e citocinas em resposta a infecções bacterianas e fúngicas, de tal forma que o bloqueio da

TREM-1 reduz a inflamação e aumenta a sobrevivência em modelos animais (BOUCHON, FACCHETTI et al., 2001). E finalmente a NOD2 é um gene que também confere resposta ao LPS e sua mutação está associada *in vitro* com redução da ativação de NF- κ B após estímulo com várias bactérias gram negativas (OGURA, BONEN et al., 2001).

Em resumo (vide figura 1), os TLRs são proteínas que vão fazer o reconhecimento de microorganismos infectantes em mamíferos. Fazem parte de nossa imunidade inata, iniciando a maior parte dos fenômenos que ocorrem no curso da infecção. Para fazer a sinalização, eles necessitam de proteínas adaptadoras – MyD88, MAL/TIRAP, TRIF e TRAM - que atuam como homodímeros ou heterodímeros propiciando então a transdução de sinal com conseqüente ativação de proteoquinases e fatores de transcrição, resultando na liberação de citocinas inflamatórias e assim promovendo uma resposta pró-inflamatória.

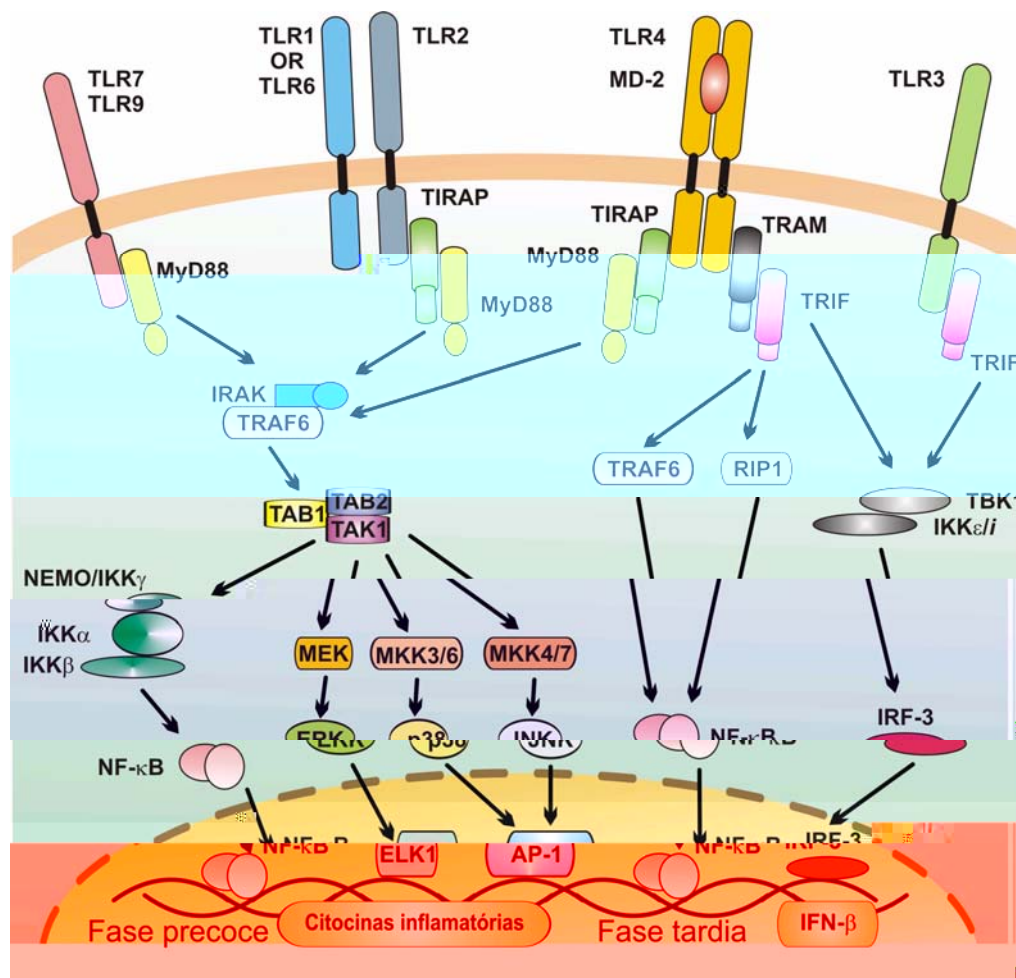


Figura 1: Relação entre Toll-like receptors (TLRs), suas proteínas adaptadoras, as proteínquinases relacionadas a estas e os efeitos da sinalização. A MyD88 é uma proteína adaptadora utilizada na sinalização de todos os TLRs à exceção do TLR3. Ela interage com a IRAK que por sua vez atua em conjunto com TRAF6 e em última instância, vão promover a ativação de NF-κB, das MAP quinases e da JNK. Essas vias vão levar à produção de citocinas como TNF e outras citocinas pró-inflamatórias. Isso também ocorre com o TLR2 e o TLR4. Mas estes promovem a sinalização por meio de uma segunda proteína adaptadora, a MAL/TIRAP cuja função principal parece ser de ponte no recrutamento de MyD88. O TLR3 sinaliza através da TRIF que interage com a TBK1 levando à ativação de IRF3 e assim liberação de INF-β.

As células mononucleares exercem um papel importante na liberação dessas citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 and TNF- α e outras incluindo IL-12 e IL-15. Essa resposta inflamatória é mediada tanto por interação celular como por mediadores solúveis e existem outros múltiplos fatores e substâncias envolvidas na resposta inflamatória tais como quimiocinas, complemento, a cascata de coagulação e o endotélio, todos ocorrendo de forma inter-relacionada e orquestradamente.

Entretanto, esse aumento na liberação de mediadores pró-inflamatórios é apenas parte de todo esse cenário imunológico. Também ocorre liberação de mediadores antiinflamatórios como IL1-ra (IL-1 recetor antagonist), IL-10 e receptores solúveis de TNF- α (GOLDIE, FEARON et al., 1995), de tal modo que a sepse pode ser descrita muito mais como um desequilíbrio do sistema imune inato do que simplesmente como um fenômeno relacionado à liberação exagerada de mediadores inflamatórios. E talvez isso até possa explicar as falhas nos principais ensaios clínicos já utilizados no tratamento do choque séptico com substâncias antiinflamatórias (ABRAHAM, 1999).

- **Ativação celular**

O reconhecimento da infecção pelo organismo desencadeia a ativação de populações celulares distintas, conseqüente à sinalização e liberação de todo esse aparato pró e antiinflamatório. As principais células envolvidas são os neutrófilos, monócitos e linfócitos, bem como macrófagos teciduais, células dendríticas e eosinófilos.

Os neutrófilos e os monócitos constituem o principal arsenal de células inflamatórias circulantes apesar de estarem normalmente em um estado de não ativação. A ativação celular é classicamente descrita em termos de sensibilização e ativação. A sensibilização pode ser definida como processo pelo qual a resposta de uma célula inflamatória a um estímulo está significativamente potencializada em decorrência de exposição prévia a um agente estimulante (CONDLIFFE, KITCHEN et al., 1998). Dentre os agentes estimulantes melhor descritos estão o LPS e o fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine) comuns às bactérias gram negativas e gram positivas respectivamente, sendo que ambos têm receptores específicos (BELLINGAN, 1999). E uma vez que essas células inflamatórias são provocadas por bactérias ou produtos bacterianos como os descritos acima, elas são rapidamente transformadas em células ativas com grande capacidade em liberar mediadores, enzimas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (GOSLING, 1998).

A ativação aumenta o número de neutrófilos pela aceleração do processo de maturação com conseqüente aumento da liberação de precursores pela medula óssea. Os monócitos circulantes também aumentam em número e ambas as células vão se dirigir ao sítio infeccioso orientadas por agentes quimiotáticos e moléculas de adesão. As moléculas de adesão, por exemplo, aumentam sua expressão e função na presença de citocinas inflamatórias (LEY, 1996). Como resultado, ocorre aumento da expressão de selectinas, mais propriamente as P, E e L selectinas e também aumento da função das integrinas que já são constitutivamente expressas e de CD66 que é membro da família do antígeno carcino-embriônico (VARKI, 1994)

Classicamente, a adesão leucocitária é descrita em termos de rolamento, adesão firme e transmigração. As selectinas – E (CD62E), P (CD62P) e L (CD62L) – medeiam a baixa afinidade de neutrófilos e monócitos em se ligarem ao endotélio (JUNG, RAMOS et al., 1998). Os três tipos de selectinas conhecidos foram denominados de acordo com o tecido no qual eles foram identificados: as L-selectinas são encontradas nos leucócitos e são responsáveis pelo endereçamento ("homing") dos linfócitos para os linfonodos; as E-selectinas aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias, sendo que uma pequena quantidade é encontrada em vários leitos vasculares e parecem ter significado importante para a migração dos leucócitos; e as P-selectinas são armazenadas em alfa-grânulos das plaquetas e corpos de Weibel-Palade (vesículas intracitoplasmáticas) das células endoteliais, e são prontamente posicionadas na membrana plasmática após uma estimulação específica.

Por meio da interação com glicoproteínas ligantes, as selectinas promovem o contato temporário dos leucócitos com o endotélio permitindo assim uma adesão firme mediada pelas integrinas. As principais integrinas relacionadas à adesão leucocitária são as do grupo beta-2, embora muitas outras podem estar participando desse processo como a PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) ou CD31 e integrinas do grupo beta-1 (CD29/CD49d). As integrinas beta-2 são heterodímeros com uma cadeia beta-2 comum (CD18) ligada a uma das três cadeias alfa (CD11a, CD11b e CD11c) formando LFA-1, Mac-1 e p150/95 respectivamente. Os principais ligantes endoteliais dessas integrinas são ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e VCAM-1 (CD106). A VCAM-1 liga-se à VL-4 e a PECAM liga-se a outras

moléculas PECAM, sendo estas, a VL-4 e a PECAM, essenciais na transmigração dos leucócitos (MEERSCHAERT e FURIE, 1995). Vide figura 2 abaixo.

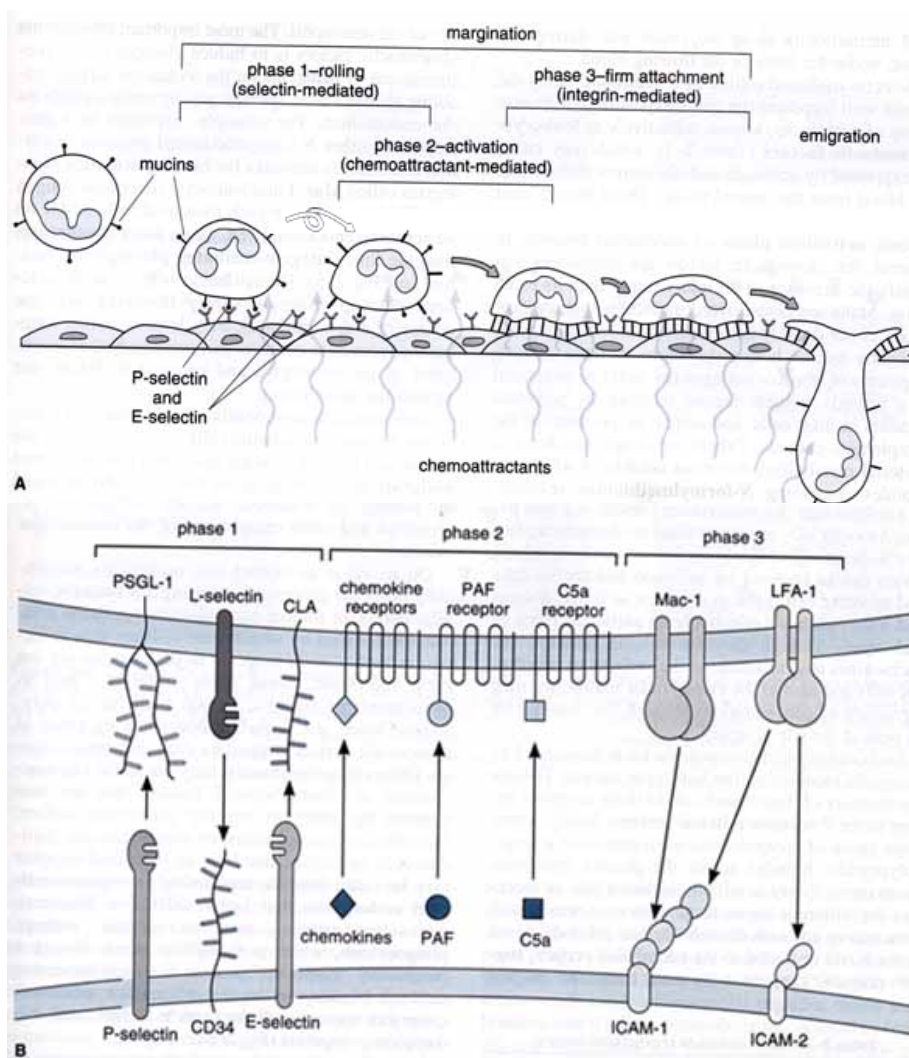


Figura 2. Migração e marginalização de neutrófilos. Na figura A estão representados os processos de rolamento, adesão firme ao endotélio ativado e posterior migração para o foco infeccioso. A fase 1 de rolamento é mediada pelas selectinas, a fase 2 de ativação depende de substâncias quimioatrativas e a fase 3 de adesão é realizada pelas integrinas.

B) Representação das superfícies moleculares dos neutrófilos e das células endoteliais com os seus respectivos ligantes durante os processos de marginalização e migração.

PSGL-1 - Glicoproteína Ligante da P-selectina; CLA - Antígeno Cutâneo Linfocitário; PAF - Fator Ativador Plaquetário; C5a - Derivado de Complemento; ICAM-1 e ICAM-2 – ligantes endoteliais de integrinas.

O CD66 também tem papel definido nesse processo de adesão endotelial via E-selectinas (KUIJPERS, HOOGERWERF et al., 1992). Além de participar facilitando a adesão mediada pelas β 2-integrinas, (KUIJPERS, VAN DER SCHOOT et al., 1993) também potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio (STOCKS, KERR et al., 1995). Mais recentemente, Feuk-Lagerstedt e colaboradores (FEUK-LAGERSTEDT, JORDAN et al., 1999) mostraram a importância do CD66 na indução da ativação da NADPH-oxidase em neutrófilos.

A deficiência de moléculas de adesão pode determinar uma ativação celular inadequada frente a bactérias. Pacientes com deficiência de CD18, por exemplo, possuem leucócitos com inabilidade de transmigração, a despeito de número normal ou até aumentado de neutrófilos circulantes e sofrem de infecções de repetição (KUIJPERS, VAN LIER et al., 1997).

1.2. METABOLISMO OXIDATIVO

O hospedeiro está preparado para reconhecer microorganismos invasores e promover ativação celular. Mas isso não é suficiente, ele tem que eliminar esses microorganismos. A erradicação de microorganismos invasores pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos depende em grande parte da capacidade fagocítica (SEGAL, 2005) e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o “burst” ou explosão respiratória. Essas ERO são produzidas no interior dos fagossomos por uma série de reações iniciadas pela NADPH oxidase (BABIOR, 1999).

Em estudo prévio, nosso grupo encontrou uma maior capacidade fagocítica de neutrófilos de pacientes com sepse grave e choque séptico comparados a indivíduos sadios (MARTINS, KALLAS et al., 2003). Outros estudos corroboram nossos achados; TRINKLE e colaboradores (TRINKLE, WELLHAUSEN et al., 1987) em estudo de medida de fagocitose e metabolismo oxidativo em neutrófilos de sangue total de pacientes sépticos e indivíduos sadios, mostraram que neutrófilos de ambos os grupos, incubados previamente com LPS durante uma hora, apresentaram aumento na fagocitose e no metabolismo oxidativo quando comparados aos controles, isto é, neutrófilos que não foram previamente expostos à endotoxina. Em 1992, BÖHMER e colaboradores (BOHMER, TRINKLE et al., 1992) também demonstraram, em indivíduos sadios, aumento na capacidade fagocítica de neutrófilos incubados com LPS. Entretanto, os estudos sobre fagocitose em sepse não são tão numerosos como aqueles relacionados ao metabolismo oxidativo, apesar de igualmente conflitantes. Há relatos de diminuição da capacidade fagocítica de neutrófilos de pacientes com sepse por gram-negativo (WENISCH, PARSCHALK et al., 1999). SOOKHAI e colaboradores (SOOKHAI, WANG et al., 1999) também encontraram diminuição da capacidade fagocítica de neutrófilos de pacientes com SRIS.

A chamada "explosão respiratória" de células fagocíticas foi inicialmente descrita em 1933 por BALDRIDGE & GERARD (VLESSIS, GOLDMAN et al., 1995). Refere-se à grande capacidade dessas células em consumir oxigênio frente a estímulos por bactérias, antígenos bacterianos, ou mesmo estímulos artificiais como forbol miristato acetato (PMA), N-formil metionil leucil fenilalanina (fMLP) (BASS, PARCE et al., 1983), entre outros.

Posteriormente foi descrita em detalhes e é conhecida como metabolismo oxidativo, que é o resultado do consumo aeróbio de O_2 durante a oxidação de substratos para a provisão de energia para a célula na forma de adenosina trifosfato (ATP).

Uma vez fagocitados, os microorganismos ficam expostos a agentes bactericidas resultantes, em parte, dos produtos liberados pela degranulação dos neutrófilos e em grande parte das ERO. A ativação do metabolismo oxidativo como dito anteriormente, envolve a NADPH oxidase, um complexo enzimático formado por quatro subunidades separadas - a p40, a p47 e a p67 que fazem parte do citosol, e o complexo protéico de membrana p22 - p91, também conhecido como citocromo b558 (WITKO-SARSAT, RIEU et al., 2000). A NADPH oxidase pode ser ativada por substâncias como o zimosan nos neutrófilos ou por outro estímulo bacteriano qualquer (por exemplo, LPS e fMLP).

Uma vez que os neutrófilos estão ativados, ocorre fosforilação da subunidade p47 e componentes do citosol migram para a membrana plasmática aonde vão se associar ao citocromo b558 e juntos constituem um complexo enzimático capaz de gerar ânion superóxido (O_2^-) a partir da forma molecular comum do oxigênio (O_2), em uma reação catalisada pela NADPH oxidase. Assim temos: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP + H^+$ (BEUTLER, 2004).

O ânion superóxido por si só não é um agente oxidante, porém funciona como substrato na produção de outras ERO nesse processo de redução de O_2 em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BABIOR, 1984), que é um substrato abundante na geração de agentes oxidantes mais poderosos,

através de reação envolvendo a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta é a principal reação que permite a geração subsequente de ERO: $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

Dentre os produtos que são gerados a partir de H_2O_2 encontram-se compostos ácidos, incluindo o ácido hipocloroso cuja formação depende da ação da mieloperoxidase (MPO): $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ = \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$. Estes compostos são microbicidas muito potentes com papel central no arsenal de neutrófilos, atuando diretamente na morte dos micróbios, bem como formando outros metabólitos também microbicidas, tais como oxigênio “singlet” ($^1\text{O}_2$) e a radical hidroxila (OH^\cdot) (VLESSIS, GOLDMAN, et al., 1995). Deve-se lembrar que a hidroxila também pode ser produzida independentemente de H_2O_2 e O_2^- via reação de Fenton.

Espécies reativas de nitrogênio também são produzidas através de reação espontânea tendo O_2^- como substrato: $\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$. O peroxinitrito que é o produto da reação, passa por uma segunda etapa e produz uma espécie de nitrato ainda sem denominação (BEUTLER, 2004).

A figura 3 abaixo, extraída de Beutler (BEUTLER, 2004), mostra a formação de ânion superóxido a partir de oxigênio e da NADPH e as moléculas com potencial microbicida a partir daí com suas respectivas vias e enzimas catalisadoras.

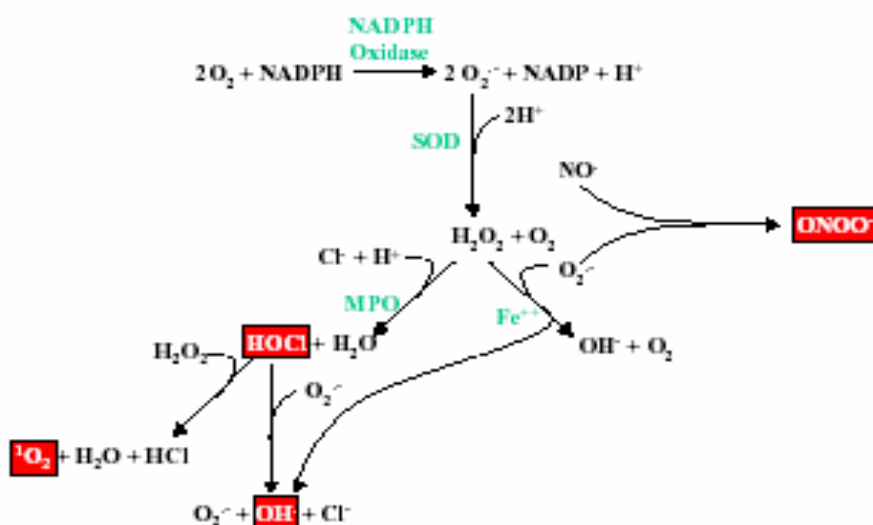


Figura 3: A figura representa a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a partir de oxigênio em reação catalisada pela NADPH oxidase. A partir daí, ocorre formação das espécies reativas de oxigênio; peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO^\cdot).

SOD – enzima superóxido dismutase
MOP - mieloperoxidase

Na sepse, há amplificação e ativação do "pool" de células fagocíticas pelo contato com a bactéria, ocasionando liberação de grandes quantidades de ERO nos tecidos. Isso pode explicar o aumento do consumo de oxigênio nessa situação (VLESSIS, GOLDMAN, et al., 1995).

As ERO possuem papel importante e benéfico na sepse, pois fazem parte do mecanismo bactericida dos neutrófilos como descrito anteriormente. Por outro lado, podem ter efeitos danosos sobre os vasos e tecidos (HIMMELFARB, HAKIM et al., 1992), podendo inclusive levar a disfunção orgânica múltipla, conforme descrevem TRAUTINGER e colaboradores (TRAUTINGER, HAMMERLE et al., 1991) em estudo envolvendo dezessete pacientes críticos internados em UTI, sem evidência de sepse à admissão.

Sete pacientes desenvolveram sepse e disfunção orgânica e apresentaram produção de ERO, estimulada por PMA, significativamente maior do que os pacientes que não evoluíram com sepse.

Em estudo prévio, encontramos aumento do metabolismo oxidativo de neutrófilos basal e frente a estímulos diversos em pacientes com sepse grave e choque séptico comparados a indivíduos saudáveis, denotando preservação de atividade ou mesmo aumento desta decorrente da sepse (MARTINS, KALLAS, et al., 2003). Por outro lado, WENISCH e colaboradores (WENISCH, PARSHALK, et al., 1999), comparando pacientes com sepse por gram-negativo e controles saudáveis, observaram uma diminuição da habilidade fagocítica e da produção de ERO pelos neutrófilos dos pacientes em relação aos controles.

1.3. Ativação e adaptação de neutrófilos e monócitos: as diferenças

1.3.1 Diferenças na ativação

A principal diferença entre a ativação de neutrófilos e macrófagos relaciona-se à função de cada uma. Os neutrófilos englobam e matam os patógenos enquanto os macrófagos têm um número maior de funções. Assim como os neutrófilos, eles reconhecem e removem estímulos inflamatórios e secretam mediadores, porém esse repertório é mais rico e inclui enzimas, mediadores lipídicos, sistema complemento, mediadores da coagulação,

componentes da matriz celular, citocinas e fatores estimuladores de colônia. Além disso, eles apresentam antígenos, desencadeiam a resposta imune adaptativa e promovem a resolução da inflamação através de debridamento tecidual e estimulação de fibrose e angiogênese. Dessa forma, podemos considerar os macrófagos como sendo os coordenadores do exército de neutrófilos e outras células ativadas (BELLINGAN, 1999).

Embora a sinalização para ambas as células seja semelhante, a resposta é bem diversa. O que se observa por parte dos neutrófilos em resposta a um determinado estímulo é um influxo rápido que logo cessa, em contraste ao influxo retardado, porém persistente de monócitos (BELLINGAN, CALDWELL et al., 1996). Existem mais contrastes também em relação à capacidade enzimática: os neutrófilos contêm mieloperoxidase e os monócitos não; os macrófagos, ao contrário dos neutrófilos, expressam óxido nítrico sintase que está relacionada à sua capacidade microbicida (LIU, BARNES et al., 1997).

1.3.2. Diferenças na adaptação

A resposta celular a antígenos bacterianos pode ser modulada in vivo e particularmente com LPS, fenômenos de hiper ou hipo responsividade podem ser observados em hospedeiros suscetíveis (FREUDENBERG, PIOTRASCHKE et al., 1992; RIGATO, SILVA et al., 2001). Assim, a resposta celular ao LPS e possivelmente a outros produtos bacterianos, em sepse clínica ou experimental, pode antecipadamente ser considerada distinta daquela apresentada por indivíduos saudáveis.

Tem sido freqüentemente relatado o fato de leucócitos de pacientes sépticos apresentarem capacidade reduzida em produzir citocinas pró-inflamatórias quando comparados a voluntários sadios. Uma das primeiras observações a respeito da hiporresposta de células circulantes em pacientes sépticos, no caso linfócitos de sangue periférico com produção diminuída de IL-2 após estímulo com PHA (fitohemaglutinina), foi descrita por Wood e colaboradores (WOOD, RODRICK et al., 1984). Ainda, em outro estudo utilizando sangue total de pacientes sépticos em comparação a indivíduos sadios, Ertel e colaboradores (ERTEL, KREMER et al., 1995) demonstraram diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β and IL-6) após estímulo com LPS. E o mesmo autor também demonstrou uma produção alterada de IFN-g em pacientes sépticos (ERTEL, KEEL et al., 1997).

No sentido de avaliar a resposta inflamatória durante a sepse, nosso grupo realizou a medida da produção *in vitro* de citocinas em sangue total seguindo-se estímulos com LPS, bactéria gram-negativa e PHA. Foi demonstrada uma produção diminuída de TNF- α e IFN- em pacientes sépticos comparados a pacientes com as mesmas comorbidades porém sem sepse e voluntários sadios (RIGATO e SALOMAO, 2003). A produção de IL-10 estava preservada o que pode sugerir que uma resposta pró-inflamatória estaria em andamento.

Em relação ao mecanismo de tolerância ao LPS exercido por monócitos, estudos animais têm resultados consistentes ao passo que aqueles considerando pacientes sépticos ainda estão parcialmente explicados. Na avaliação da interação LPS-célula em sangue total, nosso

grupo demonstrou uma produção significativamente diminuída de TNF- α em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos que ocorre a despeito da ligação do LPS à superfície celular estar preservada, sugerindo que o fenômeno de hiporesposta de monócitos não pode ser explicado apenas por diminuição da capacidade de ligação do LPS, mas principalmente por defeito na sinalização (BRUNIALTI, KALLAS et al., 2002).

Também existem controvérsias em termos de regulação funcional de neutrófilos. Estudos experimentais utilizando modelo de CLP demonstraram falência na migração de neutrófilos para o peritônio de camundongos com sepse letal ao contrário daqueles com sepse não letal em que houve preservação da migração (BENJAMIM, FERREIRA et al., 2000). Resultados semelhantes também foram observados após injeção de LPS antes da CLP; em ambos modelos a falência da migração estava relacionada ao óxido nítrico (TAVARES-MURTA, MACHADO et al., 2001). Ainda em estudo clínico conduzido por esse mesmo grupo, houve confirmação da diminuição da quimiotaxia de neutrófilos em pacientes com sepse grave e choque séptico, também relacionado à produção aumentada de óxido nítrico (TAVARES-MURTA, ZAPAROLI et al., 2002).

Em direção oposta, outras atividades também importantes dos neutrófilos tais como fagocitose e metabolismo oxidativo parecem estar preservadas ou até mesmo aumentadas. Como dito anteriormente, demonstramos um aumento do metabolismo oxidativo de neutrófilos de pacientes com sepse grave e choque séptico comparados a indivíduos saudáveis (MARTINS, KALLAS, et al., 2003). Outros estudos, em modelo experimental de CLP como o de Taylor e colaboradores (TAYLOR, GHIO et al., 1995) ou

de sepse clínica como Tanjoh e colaboradores (TANJOH, SHIMA et al., 1995), corroboram nossos achados. Por outro lado, Wenisch e colaboradores (Wenisch (WENISCH, PARSchALK, et al., 1999) demonstraram diminuição da produção de ERO e da fagocitose em pacientes com sepse por gram-negativo.

Ao que parece, monócitos e neutrófilos estão diferentemente adaptados a sepse em determinados aspectos funcionais; porém não devemos deixar de considerar que na maioria dos estudos apresentados foram realizadas avaliações de diferentes funções dessas células e talvez isso, per se, possa explicar essa diversidade de comportamento. Seria até possível que se avaliássemos o mesmo tipo de função nessas duas populações celulares pudéssemos nos deparar com processos de adaptação celular semelhantes. Por exemplo, quando avaliada a produção ex-vivo de citocinas (IL-1b, IL-1ra e IL-8) em neutrófilos de pacientes sépticos após estímulo com LPS, observou-se estar reduzida comparada a voluntários sadios, assim como relatado em monócitos (MCCALL, GROSSO-WILMOTH et al., 1993).

Fica claro que se faz necessária uma abordagem mais direcionada para avaliar a adaptação celular na sepse.

1.4. DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

O final comum a muitos doentes com sepse grave e talvez da maioria dos doentes com choque séptico é a Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas (DMOS), daí a importância em defini-la, classificá-la e quantificá-la.

Os primeiros estudos a respeito dessa síndrome datam de aproximadamente 25 anos (TILNEY, BAILEY et al., 1973). Como conceito, é uma alteração da função orgânica na evolução da sepse, do choque séptico ou da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, cuja etiologia se acredita estar relacionada ao desequilíbrio entre a resposta pró e antiinflamatória (BONE, 1996).

Estima-se que mais de metade dos óbitos em UTI podem ser atribuídos à DMOS (TRAN, GROENEVELD et al., 1990). Os principais sistemas envolvidos são o respiratório, cardiovascular, renal, hepático, gastrointestinal, hematológico, endócrino e neurológico.

Para definir e quantificar a disfunção de um ou mais órgãos, existe uma variedade de escores que utilizam marcadores fisiológicos e laboratoriais. Estes escores podem ser generalizados como o APACHE II (Acute And Chronic Health Evaluation) (KNAUS, DRAPER et al., 1985) ou o SAPS (Simplified Acquired Physiological Score) (LE GALL, LEMESHOW et al., 1993) ou podem ser mais específicos como o MODS (Multiple Organ Dysfunction Score) (MARSHALL, COOK et al., 1995), SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) (VINCENT, DE MENDONCA et al., 1998) e LODS (Logistic Organ Dysfunction System) (LE GALL, KLAR et al., 1996) que classificam as disfunções utilizando escalas ordinais, isto é, graduando cada uma delas. Dessa forma são capazes de quantificar a gravidade em um ou mais órgãos isolada ou conjuntamente, embora não possam sugerir se a disfunção é reversível ou não. Entretanto podem auxiliar no seu seguimento e até mesmo sugerir mudanças no tipo de tratamento adotado (MARSHALL, 1999).

Considerando todas essas informações a respeito de ativação celular e diferentes respostas de adaptação na sepse, continua evidente que ainda não se fez possível estabelecer conceitos unificados nesse assunto complexo denominado fisiopatologia da sepse. Assim, o maior conhecimento dos mecanismos responsáveis pela perda do equilíbrio entre as respostas pró e antiinflamatórias, possivelmente pode diminuir a distância existente entre os estudos experimentais e os ensaios clínicos e, dessa forma, contribuir para a diminuição da letalidade dessa patologia através de novas perspectivas terapêuticas.

OBJETIVOS

Objetivos

1. Avaliar o estado de ativação dos neutrófilos durante o continuum das manifestações clínicas da sepse.

Para tanto foram estudados, em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico:

- expressão dos receptores de superfície CD11b, CD11c e CD66
- expressão de TLR4 e TLR2, “transdutores” de sinal de ativação celular para LPS e outros produtos bacterianos, respectivamente.
- metabolismo oxidativo basal, isto é, sem estímulo e após estímulos com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*.

2. Avaliar o estado de ativação dos monócitos através do metabolismo oxidativo nas mesmas condições utilizadas no ensaio de neutrófilos.

3. Avaliar a associação do estado de ativação de neutrófilos e monócitos com a disfunção de órgãos mensurada pelo SOFA em pacientes com sepse grave e choque séptico.

MÉTODOS

3. Casuística

3.1 Voluntários sadios:

Foram considerados 17 voluntários sadios de diferentes faixas etárias que não estavam em uso de qualquer tipo de medicação.

3.2 Pacientes:

Foram incluídos 41 pacientes com quadro clínico laboratorial de sepse, sepse grave ou choque séptico, classificados de acordo com as definições do consenso de 1992 (BONE, SIBBALD et al., 1992) e revistas em 2001 (LEVY, FINK et al., 2003), admitidos no Hospital São Paulo e no Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo.

3.2.1 Critérios de inclusão

A inclusão dos pacientes foi realizada em até 72 horas depois do diagnóstico clínico de sepse ou de 48 horas de manifestada a primeira disfunção orgânica nos pacientes com sepse grave ou choque séptico. Os pacientes que se encontravam nas UTIs dos diferentes hospitais, foram reanimados de acordo com o protocolo padrão de tratamento de cada unidade.

3.2.2 Critérios de exclusão:

1. Pacientes menores de 18 anos ou com doença em estágio terminal, como neoplasias ou Aids.
2. Pacientes que estivessem recebendo alguma terapia experimental.
3. O evento definidor de sepse grave ou choque ocorrido há mais de 48 horas.
4. Pacientes moribundos ou com morte iminente.

Para participação no estudo, foi solicitada aos pacientes ou seus responsáveis diretos, assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética e pesquisa dos hospitais participantes. (Vide em Anexos)

3.3 Definições

Sepse: entidade clínica presente em um paciente com sítio de infecção identificado, associando-se uma resposta inflamatória sistêmica decorrente dessa infecção, onde estejam presentes sinais como: a) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; contagem de leucócitos > 12.000 ou < 4.000 células/mm³ ou formas imaturas $> 10\%$; c) frequência cardíaca > 90 bpm; d) frequência respiratória > 20 ipm ou necessidade de ventilação mecânica; e) alteração do estado mental; f) edema significativo ou balanço positivo (> 20 mL/Kg/24h); g) hiperglicemia (glicose plasmática > 120 mg/dL) na ausência de diabetes.

Sepse grave: sepse complicada por alguma disfunção orgânica refletida por hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$), disfunção renal (oligúria $< 0,5$

mL/Kg/h ou aumento de creatinina > 0,5 mg/dL), distúrbios de coagulação (RNI > 1,5 ou TTPA > 60 segundos), trombocitopenia < 100.000, hiperbilirrubinemia > 4 mg/dL, hiperlactatemia, alteração da perfusão da pele e íleo paralítico.

Choque séptico: sepse grave associada à hipotensão a despeito de adequada reposição volêmica. Entendo-se por hipotensão uma pressão sistólica < 90 mmHg ou redução de mais de 40 mmHg na pressão sistólica basal, ou ainda se houver necessidade de infusão de inotrópicos para manter níveis pressóricos adequados.

3.4 Métodos

3.4.1 Coleta de sangue

As amostras de sangue colhidas foram processadas imediatamente no laboratório de imunologia da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Para cada indivíduo sadio ou paciente séptico foram coletados:

- 60 ml de sangue em tubo contendo heparina sódica a vácuo (Becton Dickinson, Plymouth, Inglaterra) para obtenção das células mononucleares do sangue periférico e polimorfonucleares.
- 5 ml de sangue em tubo contendo EDTA a vácuo (Becton Dickinson) para análise da expressão de receptores na superfície dos neutrófilos.

3.4.2 Imunofenotipagem de neutró

Tabela 4: Paineis de anticorpos utilizados em cada tubo.

<i>Tubo</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>APC</i>
1	CD66b	mIgG _{2a}	CD14	mIgG _{2b}
2	CD66b	TLR2	CD14	CD11c
3	CD66b	TLR4	CD14	CD11b

Em seguida foram acrescentados 2 ml de solução de lise (BD Bioscience) e incubados durante 10 minutos em temperatura ambiente para lise das hemácias. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 2.500 g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente foram acrescentados aos tubos 2 ml de solução tampão fosfatada (PBS), sendo novamente centrifugados. As amostras foram suspensas em 0,3 ml de PBS a 1% azida de sódio (Sigma).

A imunofenotipagem foi lida em citômetro de fluxo como descrito a seguir.

3.4.2.1 Citometria de fluxo

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) equipado com dois lasers, um de argônio e outro de diodo, com emissão de comprimentos de ondas de 488 nm e 633 nm, respectivamente. O laser de argônio possibilita a excitação de três fluorocromos, FITC, PE e PerCP. O laser de diodo excita o fluorocromo APC. A detecção das fluorescências foi feita em escala logarítmica. As dispersões frontal e lateral de luz detectam, sem auxílio de fluorescência, tamanho e complexidade celular, respectivamente, e foram observadas em escala linear.

Desta forma foi possível detectar até seis parâmetros para cada evento adquirido, sendo que cada evento foi considerado como uma célula. A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescências foram acertadas para aperfeiçoar a aquisição de eventos. O citômetro é acoplado à unidade constituída por microcomputador Macintosh Power PC, modelo G4 (Apple Computer Inc. Cupertino, CA, EUA), que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivos.

Utilizou-se um gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz para identificação das populações de leucócitos. Desta forma foi possível estabelecer-se a região de monócitos (R1). Em outro gráfico combinou-se dispersão lateral de luz versus expressão de CD14, que possibilitou a identificação das células positivas para este receptor, estabelecendo-se a janela R2 (Figura 4). Através da combinação das janelas R1 e R2 foram adquiridos 5.000 eventos, ou seja, células que tivessem morfologia de monócitos e expressassem CD14 na superfície celular. Tanto a aquisição dos eventos quanto a análise dos resultados foram realizadas através do programa CellQuest (BD Bioscience).

Como mostrado na Figura 4A, durante a análise dos dados foi utilizado gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz definindo-se uma região na morfologia de monócitos/neutrófilos (R1). Em outro gráfico (figura 5A) mostrando expressão de CD66b (neutrófilos) versus expressão de CD14 (monócitos), desenhou-se outra região (R2) nas células CD14+ (CD14 positivas). Combinando os eventos contidos nas janelas R1 e R2 foi possível identificar os monócitos de maior tamanho e excluir a contaminação de neutrófilos (Figura 5B). Para análise da expressão dos receptores TLR2,

TLR4, CD11b e CD11c na superfície celular foram utilizados gráficos de histograma. Isotipos controles foram utilizados em cada situação (Figura 5C).

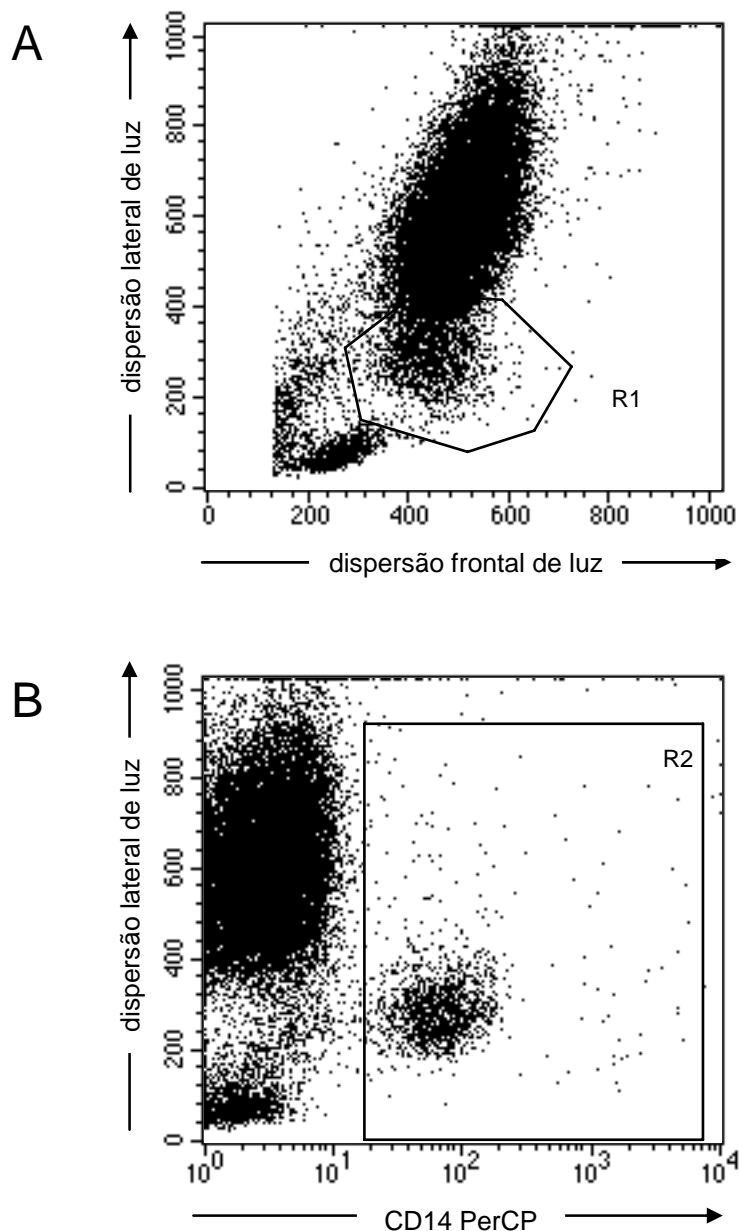


Figura 4: Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total. O gráfico A acima mostra a dispersão frontal de luz (abscissa) e dispersão lateral de luz (ordenada), correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos. O gráfico B abaixo mostra expressão de CD14 (abscissa) e dispersão lateral de luz (ordenada). A região 2 (R2) separa os eventos CD14+. Durante a aquisição foram armazenados 5.000 eventos combinando as regiões R1 e R2.

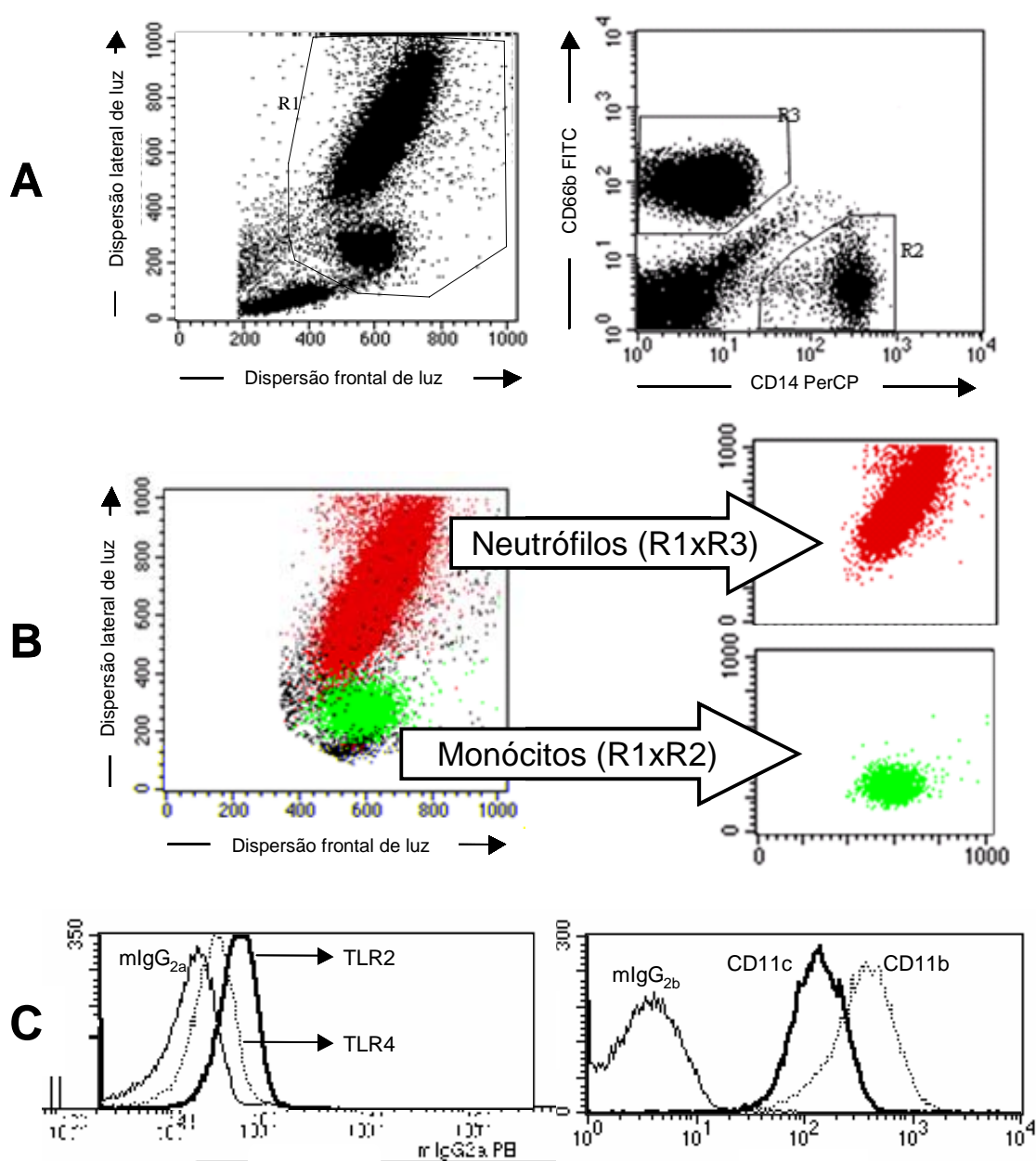


Figura 5 Estratégia de análise de monócitos e neutrófilos em sangue total. **(A)** O gráfico a esquerda mostra a dispersão frontal e lateral de luz, correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos e neutrófilos. O gráfico da direita mostra na região 2 (R2) as células CD14+ (monócitos) e a região 3 (R3) mostra as células CD66b+ (neutrófilos). **(B)** A estratégia de análise proporciona uma boa definição das populações de monócitos (R1xR2) e neutrófilos (R1xR3). **(C)** Na população de neutrófilos identificados foi analisada a expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b e CD11c através de histogramas. Isotipos controles foram usados em cada situação.

3.4.3 Preparo do sangue para o ensaio de metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos

Um mL do sangue coletado em tubo com heparina dos voluntários sadios e dos pacientes foi utilizado para realização dos ensaios de metabolismo oxidativo de neutrófilos e de monócitos. Foi feita diluição volume:volume em soro fisiológico estéril 0,9% (Áster, Sorocaba, SP, BR).

Para a mensuração do metabolismo oxidativo, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando o fluorocromo 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA tem a propriedade de penetrar rapidamente nas células por meio de difusão. Uma vez no espaço intracelular, é hidrolisado por esterases intracelulares transformando-se em 2'7' -diclorofluoresceína (DCFH) que é um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este, por sua vez, reage com as ERO, em particular com o peróxido de hidrogênio, sofrendo oxidação, resultando em compostos altamente fluorescentes, diclorofluoresceína (DCF), cuja luz é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo (Figura 6) (BASS, PARCE et al., 1983).

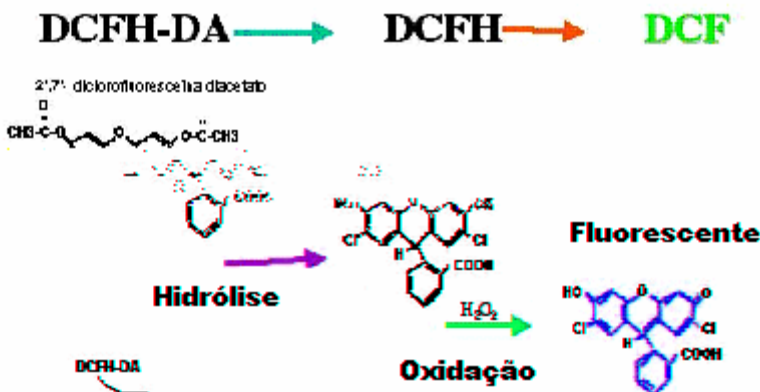


Figura 6: Formação de DCF a partir de DCFH-DA. O DCFH-DA penetra nas células por difusão e uma vez no espaço intracelular é hidrolisado por esterases intracelulares, transformando-se em DCFH, composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este por sua vez é o composto que reage com as espécies reativas de oxigênio, sofre oxidação e assim se transforma em DCF, composto altamente fluorescente cuja luz é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo.

Nos ensaios foram observadas: a produção espontânea de espécies reativas de oxigênio, bem como a produção após estímulos variados. 1- com N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), que é um peptídeo sintético que possui uma seqüência de aminoácidos análoga à encontrada em proteínas sintetizadas exclusivamente por bactérias gram-positivas; 2- com forbol-miristato-acetato (PMA); 3- com o LPS de *Salmonella abortus equi* e 4- com cepas de *S. aureus*.

Os tubos foram preparados conforme a tabela 5 abaixo. Consideramos um tubo controle - tubo 1, e os demais para mensuração do metabolismo oxidativo.

Tubo	Sangue total	DCFH-DA (0,06 mM)	<i>S. aureus</i> (2,4 x 10 ⁹)	PMA/FMLP/LPS 100ng/100ng/500ng/ml	PBS	CD 14 PerCP
1	100 µl				1000 µl	4 µl
2	100 µl	200 µl			800 µl	4 µl
3	100 µl	200 µl	100 µl		700 µl	
4	100 µl	200 µl		100 µl – PMA	700 µl	
5	100 µl	200 µl		100 µl – FMLP	700 µl	4 µl
6	100 µl	200 µl		100 µl - LPS	700 µl	4 µl

Os tubos foram incubados por 30 minutos em banho-maria com agitação a 37⁰C. Após foi adicionado 2 ml de solução EDTA a 3 mM para parar a reação, seguindo-se centrifugação por 10 minutos a 1800 rpm. Após desprezar o sobrenadante, foi realizada lise hipotônica, 2 ou 3 vezes, com NaCl 0,2% e 1,6% seguida de nova centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos a 25⁰C. O sobrenadante foi desprezado e foram então acrescentados 4 µl de CD14 PerCP (BD Bioscience) aos tubos 1, 2, 5 e 6. Todos os tubos foram incubados no escuro, em temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foi realizada lavagem com PBS seguida de nova centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos a 4^o C. Depois os tubos foram homogeneizados e a cada um foram adicionados 300 µl de EDTA 3mM para leitura em citômetro de fluxo.

3.4.3.1 *Citometria de fluxo*

A aquisição dos dados foi realizada através das dispersões frontal (FSC, forward scatter) e lateral de luz (SSC, side scatter) que representam, respectivamente, o tamanho e a granulosidade das células (Figura 1A).

Entretanto, uma vez que nesse novo ensaio estamos utilizando sangue total, faz-se necessário a criação de uma nova área de análise para que as diferentes populações celulares possam ser identificadas. Para tanto, utilizou-se um gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz para identificação das populações leucocitárias, estabelecendo-se assim a região R1 de neutrófilos e R2 de monócitos. Em outro gráfic

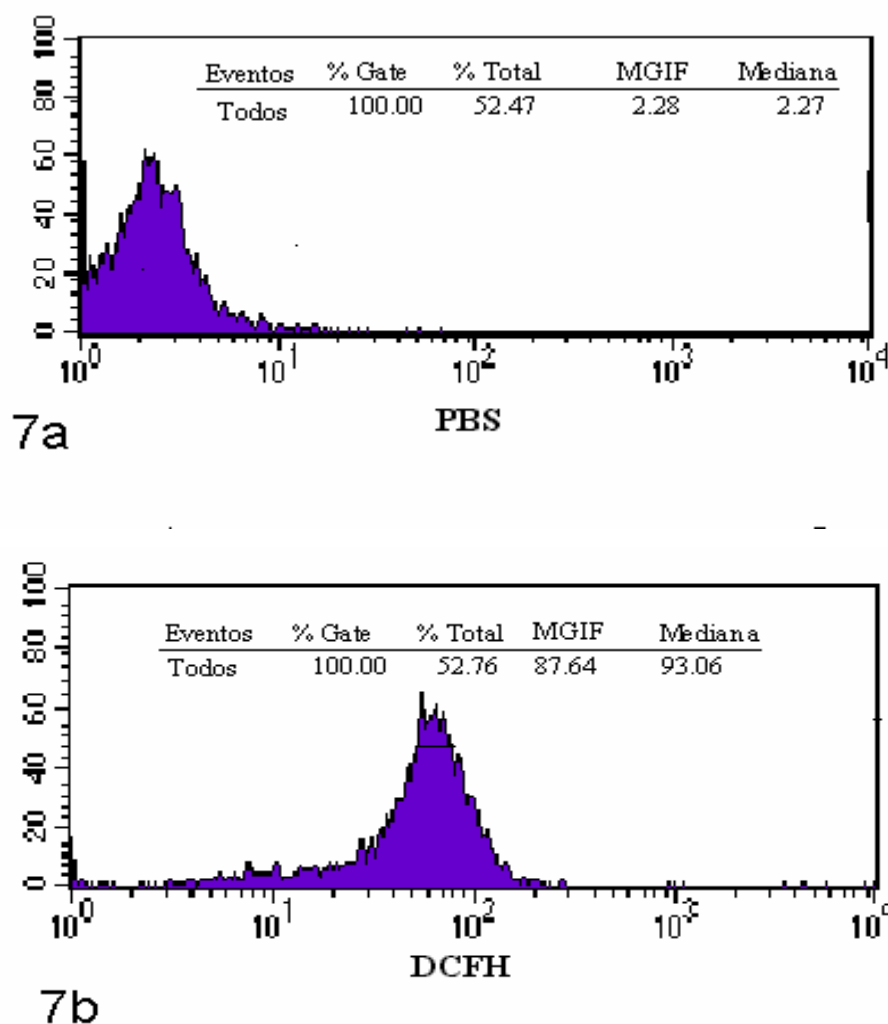


Figura 7: Histogramas representando a produção de ERO basal, considerando-se a média geométrica de intensidade de fluorescência (MGIF). A figura 7a corresponde ao histograma do tubo 1 (tubo controle), que é preparado somente com PBS e apresenta uma MGIF de 2,28. A figura 7b, representa o histograma do tubo 2, preparado com PBS e DCFH, e corresponde ao metabolismo basal. O deslocamento do conjunto de células para a direita, equivale à produção de ERO na presença de DCFH e, nesse exemplo, apresentou MGIF de 87,64 (MARTINS, KALLAS et al., 2003).

3.5 Medidas Clínicas e laboratoriais

Os pacientes incluídos no estudo foram avaliados clinicamente no momento da inclusão e ao longo de 28 dias para verificar mortalidade. Todo óbito ocorrido neste período foi considerado direta ou indiretamente relacionado ao quadro de sepse, exceto nas situações onde o evento séptico esteve claramente resolvido e o óbito ocorreu por complicação da doença de base, quando existente.

Foi calculado SOFA (VINCENT, DE MENDONCA et al., 1998) no dia de admissão na UTI que necessariamente coincidiu com o dia da coleta do sangue para processamento das amostras.

O SOFA foi desenvolvido em 1996 e tem como finalidade quantificar as disfunções de órgãos em pacientes com sepse grave e choque séptico admitidos em UTI. São atribuídos pontos para cada grau de disfunção, calculados por análise de regressão logística. É um índice descritivo e, portanto não deve ser utilizado como preditor de mortalidade.

Como se pode observar na tabela 6 abaixo, a disfunção em determinado órgão ou sistema aumenta ou diminui de acordo com a pontuação, isto é, quanto maior o SOFA, maior o grau de disfunção orgânica.

Tabela 6. Sepsis-related Organ Failure Assessment – SOFA

Órgão ou sistema	Variáveis	1	2	3	4
Respiratório	PaO ₂ / FiO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200 Com suporte ventilatório	< 100
Coagulação	Plaquetas x 10 ³ / mm ³	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático	Bilirrubinas (mg/dL)	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12
Cardiovascular	Hipotensão	PAM < 70 mmHg	Dopamina 5 ou Dobutamina (qualquer dose)	Dopamina > 5 ou epinefrina 0,1 ou norepinefrina 0,1	Dopamina > 15 ou epinefrina > 0,1 ou norepinefrina > 0,1
Neurológico	Escala de coma de Glasgow	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Renal	Creatinina (mg/dL) ou débito urinário	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ou < 500 mL/dia	> 5,0 ou < 200 mL/dia

3.6 Análise estatística

Os resultados do metabolismo oxidativo e de imunofenotipagem foram transferidos para uma planilha de dados dos programas Excel 2003 (Microsoft, Corporation, Seattle, WA, EUA) e SPSS 13.0 (SPSS Inc. and Predictive Analytics, Chicago, IL, EUA), e foram expressos em mediana e suas variações máxima e mínima e os percentís. A análise da comparação entre os grupos foi feita por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Quando a comparação foi feita entre os grupos de indivíduos sadios e o conjunto dos pacientes sépticos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Quando a variável foi comparada entre os quatro grupos (sadios, sepse, sepse grave e choque séptico) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para os testes com $p = 0,10$ foi então utilizado Mann-Whitney para se estabelecer a diferença entre os grupos, sendo esta considerada significativa quando o valor de p observado foi menor que 0,05.

A análise do SOFA foi feita utilizando o cálculo da área sob a curva (curva ROC).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Sobre os pacientes

Foram incluídos 41 pacientes com diagnóstico clínico laboratorial de sepse, sepse grave e choque séptico. Também foram incluídos 17 voluntários sadios de diferentes faixas etárias. Todos os pacientes apresentaram pelo menos três dos critérios diagnósticos de sepse de acordo com o consenso de 1992 (BONE, SIBBALD et al., 1992).

Os pacientes foram analisados como um grupo único em comparação ao grupo de voluntários sadios. Além disso, estadiamos o grupo de pacientes em grupo de sepse (GS), grupo de sepse grave (GSG) e grupo de choque séptico (GCS), ou seja, de acordo com o estado de gravidade e comprometimento sistêmico. Assim classificados, os diferentes grupos foram comparados ao grupo de voluntários sadios e também entre si.

O grupo de pacientes constituiu-se de 14 pacientes com sepse, 12 pacientes com sepse grave e 15 pacientes com choque séptico. A média de idade foi de $55,1 \pm 20,2$ anos e $36,4 \pm 16,1$ anos ($p=0,001$) no grupo de pacientes e de voluntários sadios respectivamente. A mortalidade global de 28 dias foi de 24,4% (10/41) e a mortalidade hospitalar global foi de 36,6% (15/41).

Os sítios de infecção suspeitos ou documentados foram: pulmão – 48,7%, trato urinário – 19,5%, abdome – 14,6%, sangue – 9,7%, outros e mais de um sítio infeccioso – 19,5%. Dez pacientes (24,4%) apresentaram culturas positivas. As bactérias isoladas em cultura foram *Acinetobacter*,

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Providencia*, *Klebsiella* e *Proteus*, sendo *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* em urina, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus aureus* no sangue e os demais no pulmão.

Vinte e quatro (58,5%) pacientes apresentavam pelo menos uma comorbidade sendo as mais encontradas: hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes (DM), insuficiência cardíaca congestiva (ICC), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), insuficiência renal crônica (IRC) e outras. A mediana de SOFA encontrada foi 6,5 variando de 1 a 16, e foi diferente entre o grupo de sepse grave e de choque séptico, sendo de 4,5 (variando de 1 a 12) e de 8,5 (variando de 4 a 16), respectivamente ($p = 0,01$; teste de Mann-Whitney).

As informações clínicas, epidemiológicas e a evolução referentes aos grupos de pacientes encontram-se na tabela 7.

4.2. Comparação dos grupos estudados

4.2.1. Expressão de marcadores de superfície em sangue periférico

Nos ensaios que se seguem, foram analisadas as expressões de TLR2, TLR4, CD11b, CD11c e CD66 na superfície de neutrófilos de sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse.

4.2.1.1 Expressão de TLR2

Quando comparadas a expressão de TLR2 nos grupos de pacientes sépticos e de indivíduos sadios, observou-se tendência de diferença na expressão de TLR2 ($p=0,077$; Kruskal-Wallis). A análise entre os grupos mostrou expressão de TLR2 significativamente menor no grupo de pacientes com choque séptico em relação aos demais grupos de indivíduos sadios ($p=0,05$), com sepse ($p=0,03$) e sepse grave ($p=0,04$). As medianas das médias geométricas da intensidade de fluorescência (MGIF) foram de 11,2 (variando de 6,2 a 29,4), 13,3 (variando de 3,7 a 73,2), 13,1 (variando de 4,4 a 35,2) e 8,4 (variando de 2,4 a 29,1) respectivamente nos grupos de sadios, sepse, sepse grave e choque séptico.

Os dados estão ilustrados na figura e tabela 8.

4.2.1.2 Expressão de TLR4

Não foi observada diferença significativa da expressão de TLR4 entre os grupos de indivíduos sadios e pacientes sépticos ($p=0,601$; Mann-Whitney), tampouco quando se considerou os três grupos de sepse e o de indivíduos sadios ($p=0,297$; Kruskal-Wallis). As medianas das MGIF foram de 5,1 (variando de 2,0 a 19,3), 8 (variando de 2,5 a 15,8), 6,5 (variando de 2,3 a 18,9) e 4 (variando de 1,7 a 21,4) respectivamente nos grupos de sadios, sepse, sepse grave e choque séptico.

Os dados estão expressos na figura e tabela 9

4.2.1.3 Expressão de CD11b

Não foi observada diferença significativa da expressão de CD11b entre os grupos de indivíduos sadios e pacientes sépticos ($p=0,565$; Mann-Whitney), tampouco quando se considerou os diferentes estádios da sepse e os voluntários sadios ($p=0,340$; Kruskal-Wallis). As medianas das MGIF foram de 65,4 (variando de 12,9 a 240,7), 83,3 (variando de 38 a 234,1), 74,1 (variando de 10,8 a 202,6) e 80,6 (variando de 44,1 a 224,2) respectivamente nos grupos de sadios, sepse, sepse grave e choque séptico.

Os dados estão expressos na figura e tabela 10.

4.2.1.4 Expressão de CD11c

Não foi observada diferença significativa da expressão de CD11c entre os grupos de indivíduos sadios e pacientes sépticos ($p=0,134$; Mann-Whitney), tampouco dos grupos entre si ($p=0,448$; Kruskal-Wallis). As medianas das MGIF foram de 135,2 (variando de 29,7 a 1132,3), 210,1 (variando de 66,3 a 1269,5), 139,4 (variando de 71,7 a 968,6) e 140,4 (variando de 55,2 a 550,8) respectivamente nos grupos de sadios, sepse, sepse grave e choque séptico.

Os dados estão expressos na figura e tabela 11.

4.2.1.5 Expressão de CD66

A expressão de CD66 no grupo de pacientes sépticos foi significativamente menor em comparação ao grupo de indivíduos sadios ($p=0,01$; teste de Mann-Whitney). Quando os grupos foram comparados individualmente, também se observou diferença na expressão de CD66 ($p=0,076$; Kruskal-Wallis). A análise entre os grupos mostrou expressão de CD66 significativamente maior no grupo de pacientes com choque séptico e sepse grave em relação ao grupo de indivíduos sadios, com $p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente. Não houve diferença entre o grupo de sepse e indivíduos sadios. As medianas das MGIF foram de 61,6 (variando de 23,9 a 123,1), 73,8 (variando de 26 a 175,3), 78,1 (variando de 35,9 a 140,9) e 87,6 (variando de 27,8 a 136,1) respectivamente nos grupos de sadios, sepse, sepse grave e choque séptico.

Os dados estão ilustrados nas figuras e tabelas 12 e 13.

4.2.2. Metabolismo oxidativo

4.2.2.1. Metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos em sangue total

Foram analisadas as produções de espécies reativas de oxigênio (ERO) em neutrófilos e monócitos em cinco condições distintas compreendendo: basal, isto é, sem estímulo, e após estímulos com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*.

A análise foi feita comparando-se os grupos de indivíduos sadios com o conjunto de pacientes sépticos em cada uma das condições citadas pelo teste de Mann-Whitney, o grupo de indivíduos sadios com os diversos grupos de pacientes e os grupos de pacientes entre si pelo teste de Kruskal-Wallis; havendo significância, foi feita a comparação grupo a grupo utilizando o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos em MGIF.

4.2.2.2. Metabolismo oxidativo de neutrófilos

- *Comparação entre o grupo de voluntários sadios e pacientes sépticos*

A produção de ERO esteve significativamente aumentada no grupo de pacientes sépticos em relação ao grupo de indivíduos sadios em todas as condições testadas ($p < 0,001$).

A média de incremento na produção de ERO após os diversos estímulos em relação à condição basal não diferiu entre os grupos ($p = 0,857$).

A representação das medianas das MGIF e suas variações (mínimo e máximo), bem como os percentís de 25% e 75% e os seus valores estão expressos na figura e tabela 14.

- *Comparação dos grupos entre si*

A comparação dos grupos de pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico em relação ao grupo de voluntários sadios mostrou uma produção de ERO significativamente maior nas condições basal e após estímulo com LPS e *S. aureus*. Na condição basal, a comparação entre voluntários sadios e os grupos de sepse, sepse grave e choque séptico mostrou $p=0,008$, $p=0,05$ e $p=0,0001$ respectivamente. Após estímulo com LPS observou-se $p=0,001$, $p=0,013$ e $p=0,0001$ em relação aos grupos de sepse, sepse grave e choque séptico respectivamente, e, utilizando-se *S. aureus*, observou-se $p=0,0001$, $p=0,004$ e $p=0,0001$ em relação aos grupos de sepse, sepse grave e choque séptico respectivamente.

Em relação aos estímulos PMA e fMLP, não foram encontradas diferenças significativas na comparação do grupo de sepse grave com o grupo de voluntários sadios. Porém, houve diferença entre este ultimo e os grupos de sepse e choque séptico. Após estímulo com PMA, $p=0,003$ e $p=0,027$ em relação aos grupos de sepse e choque séptico respectivamente. Com o uso de fMLP, $p=0,005$ e $p=0,0001$ respectivamente.

Comparando-se os grupos de pacientes sépticos entre si foi observada maior produção de ERO após estímulo com PMA no grupo de sepse comparado ao de sepse grave. As medianas foram de 267,7 (variação de 16,6 a 1630,1) e 76,6 (variação de 6 a 441,5) respectivamente, com $p=0,046$.

Estimulando-se com *S. aureus*, observou-se produção de ERO significativamente maior no grupo de sepse comparado ao de choque séptico com $p=0,04$. As medianas foram respectivamente 529 (variação de 123,3 a

1719,3) e 384,3 (variação de 167,5 a 972,1). Também houve produção de ERO significativamente maior no grupo de choque séptico comparado ao de sepse grave utilizando LPS e *S. aureus* ($p=0,028$ e $p=0,04$, respectivamente). As medianas com uso de LPS foram 117,3 (variação de 46,2 a 336,8) e 66,9 (variação de 14,8 a 126) respectivamente no grupo de choque séptico e sepse grave. Utilizando-se *S. aureus* foram respectivamente 384,3 (variação de 167,5 a 972,1) e 129 (variação de 86,5 a 930,2).

Nas demais condições não mencionadas não se observaram diferença estatística entre os grupos. Os dados estão ilustrados na figura e tabela 15.

4.2.2.3. Metabolismo oxidativo de monócitos

- *Comparação entre o grupo de voluntários sadios e pacientes sépticos*

A produção de ERO esteve significativamente aumentada no grupo de pacientes sépticos em relação ao grupo de indivíduos sadios em todas as condições testadas ($p < 0,001$, exceto após estímulo com fMLP cujo $p = 0,04$).

A representação das medianas das MGIF e suas variações (mínimo e máximo), bem como os percentís de 25% e 75% e os seus valores estão expressos na figura e tabela 16.

- *Comparação dos grupos entre si*

Observou-se uma produção de ERO significativamente maior no grupo de choque séptico comparado ao grupo de voluntários sadios em todas as condições testadas, sendo observados $p=0,0001$, $p=0,009$, $p=0,007$, $p=0,0001$ e $p=0,0001$ respectivamente nas condições basal, e após PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*.

Na comparação do grupo de sepse e sadios também se observa produção de ERO significativamente maior no primeiro grupo em quase todos os estímulos, à exceção do estímulo com fMLP ($p=0,177$). $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,0001$ e $p=0,0001$ respectivamente nas condições basal, e após PMA, LPS e *S. aureus*.

O grupo de sepse grave teve produção maior de ERO na condição basal e após estímulo com *S. aureus* em comparação ao grupo de sadios ($p=0,01$ e $p=0,001$, respectivamente).

Além disso, a produção de ERO no grupo de sepse grave foi significativamente menor em comparação ao grupo de sepse após estímulo com LPS ($p=0,01$) e ao grupo de choque séptico após estímulos com fMLP e LPS ($p=0,032$ e $p=0,008$, respectivamente).

Não houve diferença entre os grupos de sepse e choque séptico, bem como nas demais condições não mencionadas.

Os dados estão ilustrados na figura e tabela 17.

4.2.3. Análise da correlação entre expressão de receptores de superfície de pacientes sépticos e metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos

Foi avaliada a correlação entre a expressão dos receptores de superfície de neutrófilos (TLR2, TLR4, CD11b, CD11c e CD66) e de monócitos (TLR2, TLR4, CD11b e CD11c) e o metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos na condição basal e após os diversos estímulos, utilizando o teste de correlação de Pearson.

Houve correlação significativa da expressão de TLR2 em neutrófilos e o metabolismo oxidativo estimulado por PMA ($R=0,693$; $p<0,001$) e por *S. aureus* ($R=0,419$; $p=0,019$) em neutrófilos e em monócitos. Também foi observada correlação entre a expressão de TLR2 em monócitos e o metabolismo basal de monócitos ($R=0,359$; $p=0,047$), após estímulo com PMA ($R=0,377$; $p=0,044$) e estimulado por *S. aureus* ($R=0,350$; $p=0,054$).

Os dados de correlações significativas estão expressos no quadro 1. As demais correlações entre expressão de receptores de superfície e metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos não foram significativas ao nível de 0,05, e portanto os dados não estão representados.

		PMA Neutrófilo	S. aureus Neutrófilo	Basal Monócito	PMA Monócito	S. aureus Monócito
TLR2	Correlação de Pearson	,693**			,377*	
Neutrófilo	Sig. (2-tailed)	,000			,044	
	N	29			29	
TLR2	Correlação de Pearson		,419*	,359*		,350
Monócito	Sig. (2-tailed)		,019	,047		,054
	N		31	31		31

*. Correlação significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

**. Correlação significativa ao nível de 0,01 (2-tailed).

Quadro 1: O quadro representa as correlações entre marcadores de ativação de superfície de neutrófilos e de monócitos e o metabolismo oxidativo utilizando o teste de correlação de Pearson. As correlações significativas ao nível de 0,05 estão marcadas com * e ao nível de 0,01 com **. N é o número de pacientes em cada condição.

4.2.4. Análise da correlação entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos

A correlação entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos também foi avaliada utilizando-se o teste de correlação de Pearson.

Foram observadas correlações significativas em quase todas as condições testadas. Houve correlações fortemente positivas entre o metabolismo basal de neutrófilos e monócitos ($R=0,728$), entre o metabolismo de neutrófilos e monócitos induzidos por: 1 - PMA ($R=0,781$); 2 - fMLP ($R=0,934$); 3 - LPS ($R=0,755$) e 4 - *S. aureus* ($R=0,827$), e também entre o metabolismo de neutrófilos estimulado por *S. aureus* e o metabolismo de monócitos induzido por PMA ($R=0,787$), fMLP ($R=0,784$) e LPS ($R=0,774$). Para essas correlações consideradas fortemente positivas foram calculados

os R^2 (R ao quadrado) e foram consideradas associações muito boas aquelas com $R^2 > 0,60$. Os resultados apontam para uma associação muito boa na condição basal e após estímulos com PMA ($R^2=0,62$), fMLP ($R^2=0,69$), LPS ($R^2=0,85$) e *S. aureus* ($R^2=0,61$), e entre o metabolismo oxidativo estimulado por *S. aureus* em neutrófilos e fMLP em monócitos ($R^2=0,67$).

A única correlação não significativa deu-se entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulado por PMA e o metabolismo oxidativo de monócitos após estímulo com fMLP ($p=0,601$).

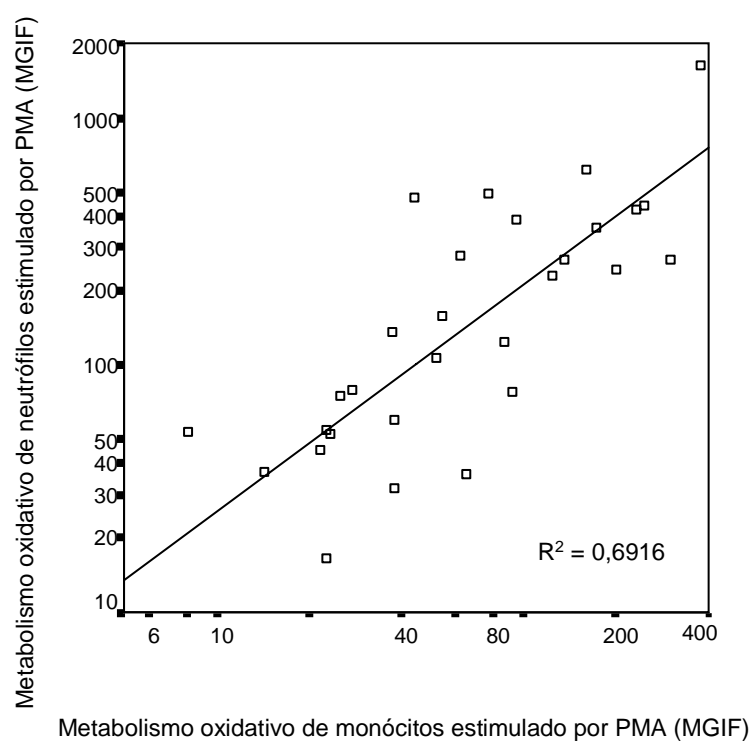
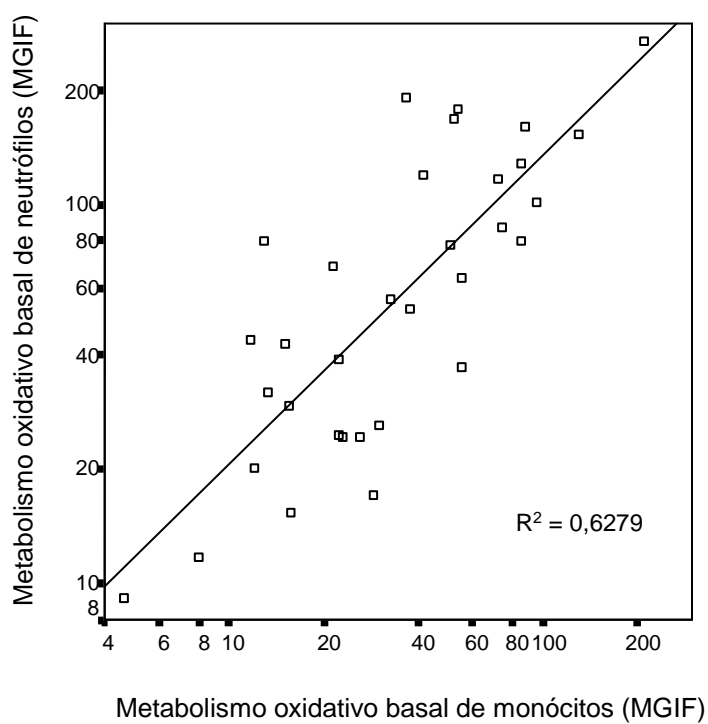
Os dados relativos às correlações estão representados no quadro 2. As representações gráficas das correlações consideradas fortemente significativas com seus respectivos R^2 estão expressas na figura 18.

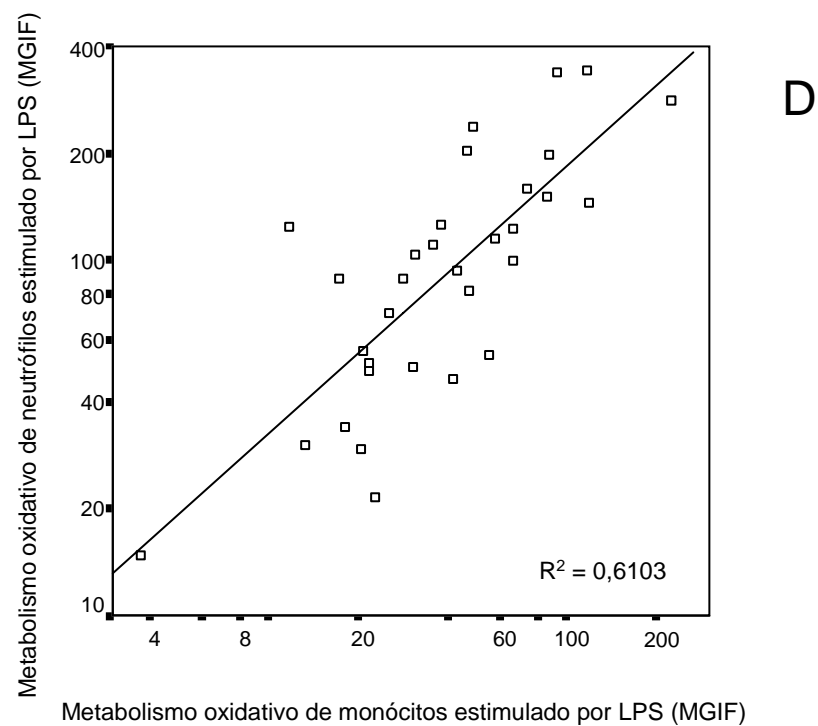
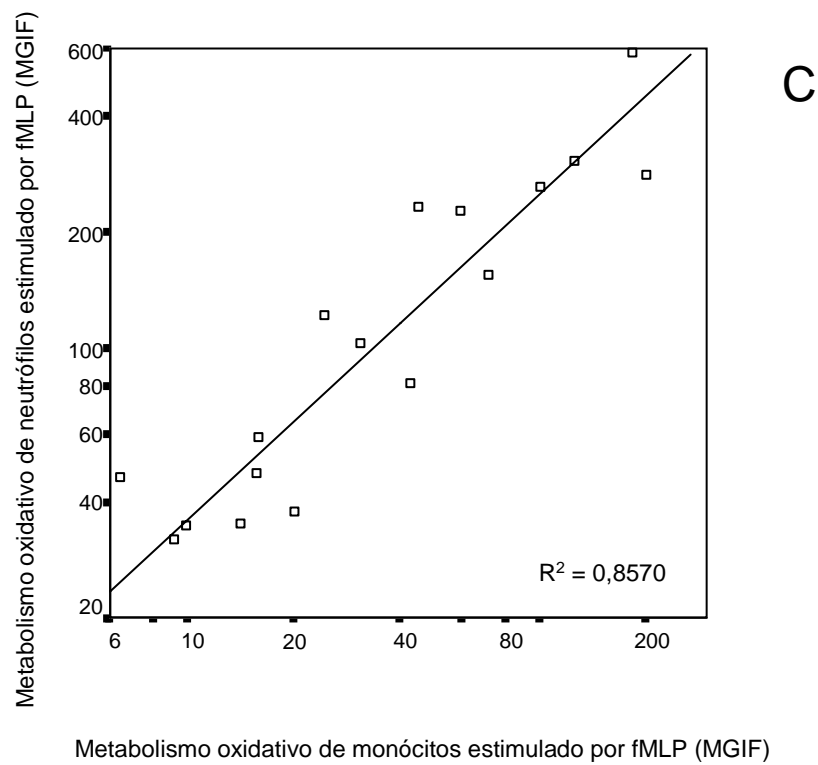
		Basal Monócito	PMA Monócito	fMLP Monócito	LPS Monócito	S. aureus Monócito
Basal Neutrófilo	Coefficiente de correlação Sig. (2-tailed) N	.728** .000 33	.579** .001 30	.600** .003 22	.604** .000 33	.434* .012 33
PMA Neutrófilo	Coefficiente de correlação Sig. (2-tailed) N	.361 .050 30	.781** .000 30	.128 .601 19	.368* .046 30	.486** .007 30
fMLP Neutrófilo	Coefficiente de correlação Sig. (2-tailed) N	.752** .000 18	.689** .004 15	.934** .000 18	.721** .001 18	.501* .034 18
LPS Neutrófilo	Coefficiente de correlação Sig. (2-tailed) N	.669** .000 32	.582** .001 29	.587** .005 21	.755** .000 32	.617** .000 32
S. aureus Neutrófilo	Coefficiente de correlação Sig. (2-tailed) N	.672** .000 32	.787** .000 30	.784** .000 21	.774** .000 32	.827** .000 32

* . Correlação significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

** . Correlação significativa ao nível de 0,01 (2-tailed)

Quadro 2: O quadro representa as correlações entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e de monócitos utilizando o teste de correlação de Pearson. As correlações significativas ao nível de 0,05 estão marcadas com * e ao nível de 0,01 com **. N é o número de pacientes em cada condição.





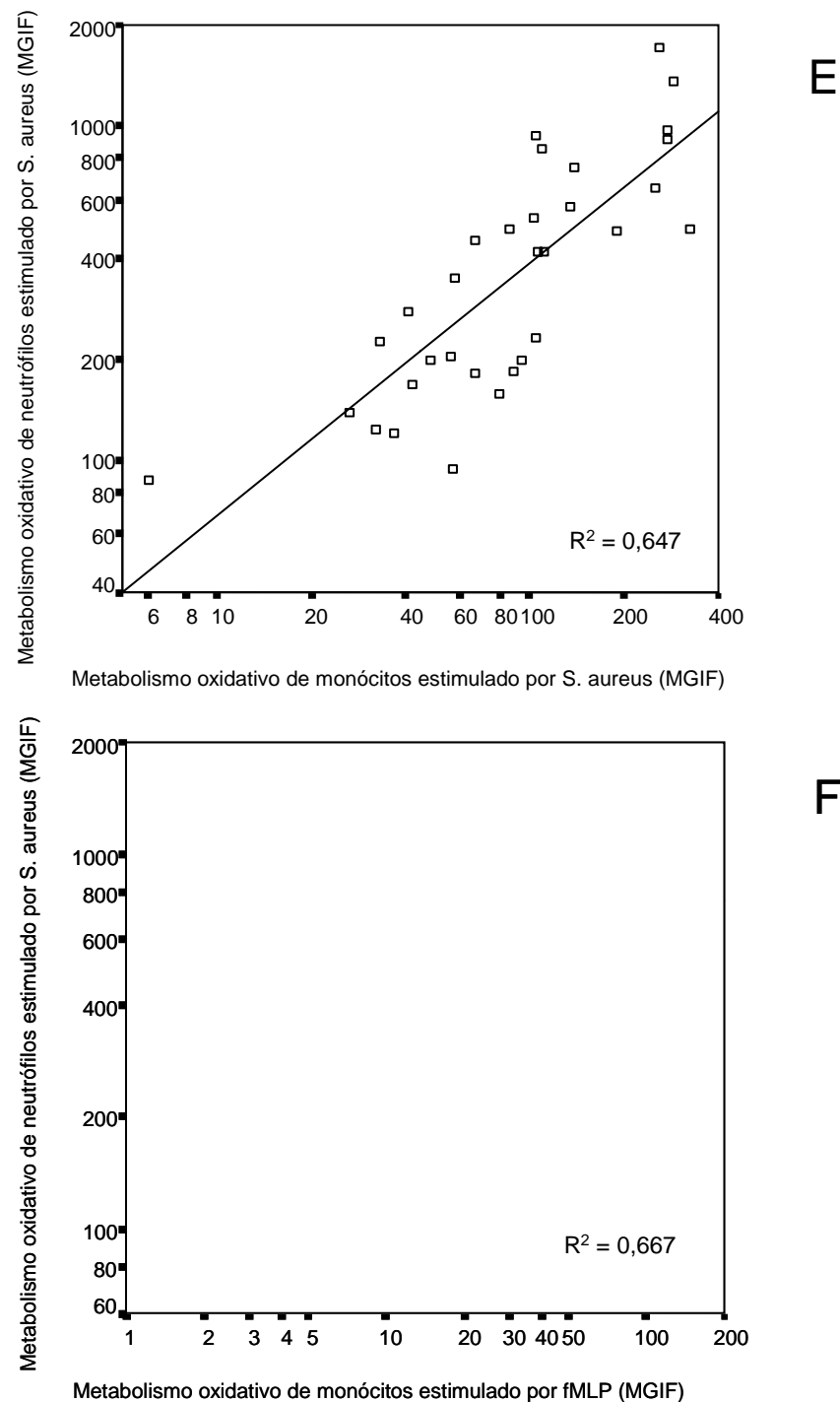
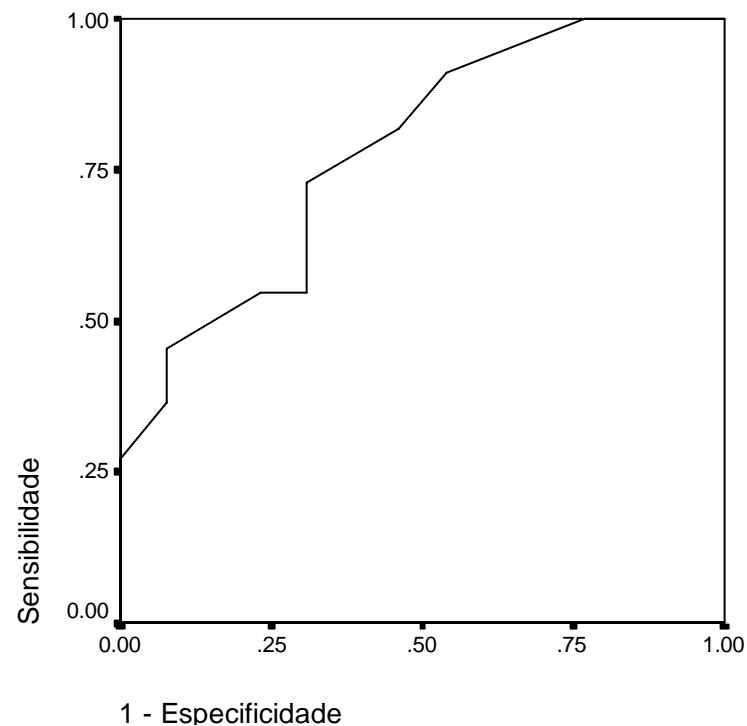


Figura 17: As figuras A, B, C, D, E e F representam as correlações entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e de monócitos nas condições em que o R^2 (R ao quadrado) é maior que 0,60. Estão representadas as correlações na condição basal (A) e após estímulo com PMA (B), fMLP (C), LPS (D), *S. aureus* (E) e *S.aureus* x fMLP (F). A linha reta representa a correlação.

4.3. Análise de disfunção de órgãos

Para os pacientes com sepse grave e choque séptico foi realizado o cálculo do SOFA. (Vide tabela 6 em métodos). Uma vez calculado, foi realizada análise através de área sob a curva (curva ROC) para o SOFA e mortalidade de 28 dias. Observou-se que SOFA foi capaz de discriminar os grupos em sobreviventes e não sobreviventes, a partir de um ponto de corte de 7 estabelecido pela curva ROC, ponto este em que foi obtida a melhor sensibilidade e especificidade do teste que foram de 72% e 70%, respectivamente. A área sob a curva obtida foi de 0,78 com intervalo de confiança (IC) de 95% de 0,6-0,96 ($p=0,02$). E a partir deste ponto de corte, foi construída tabela dois por dois e assim foi obtido o resultado do risco relativo (RR) que foi de 2,67 (IC 95% 0,93 – 7,69), ou seja, o paciente com SOFA maior ou igual a 7 tem 2,67 vezes mais chance de morrer que o paciente com SOFA menor que 7 e a mortalidade nesses grupos foi de 83,3% e 25%, respectivamente. Ainda, dez dos 12 pacientes do grupo com SOFA 7 pertenciam ao grupo de choque séptico.

A representação da curva ROC e os valores obtidos a partir do seu cálculo estão expressos no quadro 3.



Área	Erro padrão	p	IC 95%	
			Mínimo	Máximo
.780	.094	.020	.596	.964

sobrevida / óbito SOFA	Óbito	Sobrevida	Total
SOFA ≥ 7	8	≥ 4	12
SOFA < 7	3	9	12
Total	11	13	24

RR = 2,67

Quadro 3: Área sob curva do grupo de sepse grave e choque séptico com SOFA e mortalidade de 28 dias foi de 0,72 ($p=0,02$). A partir do ponto de melhor sensibilidade e especificidade do teste foi determinado o ponto de corte de 7 e então calculado o risco relativo (RR) que foi de 2,67 com IC de 95% de 0,93 a 7,69. A sensibilidade foi de 72% e a especificidade foi de 70%

4.3.1. Análise de associação entre marcadores de superfície e SOFA

Uma vez estabelecido que o SOFA proporcionou boa discriminação entre sobreviventes e não sobreviventes no 28^o dia, convencionou-se considerar os grupos como grupo com SOFA menor que 7 (SOFA<7) e grupo com SOFA maior ou igual a 7 (SOFA \geq 7).

Não foi observada diferença na expressão dos marcadores de superfície analisados (TLR2, TLR4, CD11b e CD11c em neutrófilos e monócitos e CD66 em neutrófilos) entre os grupos, embora exista uma tendência da expressão de TLR2 em neutrófilos ser menor no grupo de SOFA \geq 7 ($p=0,08$). Também não se observou correlação entre nenhuma dessas variáveis e SOFA.

4.3.2. Análise da associação entre metabolismo oxidativo e SOFA

Foi observado que o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulado por fMLP foi significativamente maior no grupo de SOFA \geq 7 comparado ao grupo de SOFA<7 ($p=0,02$), tendência também observada após estímulo por LPS ($p=0,06$). O mesmo se observou em monócitos estimulados por fMLP e LPS ($p=0,02$ e $p=0,04$, respectivamente). As medianas das MGIF e suas variações (mínima e máxima) em relação ao metabolismo oxidativo

estimulado por fMLP em neutrófilos e por fMLP e LPS em monócitos estão ilustradas na tabela 18.

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
fMLP neutrófilo SOFA<7	19,5	28,7	40,9	64,3	80,8
fMLP neutrófilo SOFA 7	35,2	60,3	174,6	269,5	584,3
fMLP monócito SOFA<7	9,12	9,21	12,7	22,6	43,2
fMLP monócito SOFA 7	6,37	16,6	38,1	152,4	201,7
LPS monócito SOFA<7	18,1	20,0	23,5	41,5	55,5
LPS monócito SOFA 7	11,6	41,6	67,4	91,1	222,6

Tabela 18: Metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulado por fMLP e de monócitos estimulado por fMLP e LPS em pacientes com SOFA<7 e SOFA 7. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

Além disso, foi observada correlação significativa entre metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos estimulados por fMLP e SOFA com $R=0,59$ ($p=0,02$) e $R=0,51$ ($p=0,03$), respectivamente. Analisando-se a representação gráfica dessa correlação, observou-se que há uma tendência de aumento linear da curva quadrática utilizada a partir de SOFA maior ou igual a sete, que coincide com o ponto de corte previamente estabelecido pela curva ROC. Assim, a partir deste ponto, há um aumento importante do metabolismo oxidativo, no caso estimulado por fMLP, conforme tem-se aumento no SOFA ou em outras palavras conforme tem-se aumento na disfunção orgânica.

Os gráficos de correlação estão representados na figura 19.

4.3.4. Análise entre os grupos de sepse, SOFA < 7 e SOFA ≥ 7

Evidenciou-se um aumento significativo da produção de ERO estimuladas por fMLP e *S. aureus* em neutrófilos ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente), e por LPS em monócitos ($p=0,04$) no grupo de sepse em comparação ao grupo de SOFA<7. A figura 20 ilustra a comparação entre esses grupos utilizando-se fMLP e *S. aureus* e na tabela 19 estão expressos os valores das medianas e suas variações.

Por outro lado, não se evidenciou diferença na produção de ERO em qualquer condição analisada quando se comparou os grupos sepse e SOFA 7.

≥

Paciente	Idade	Estadiamento	Foco infeccioso	Culturas	Número de disfunções	SOFA D1	Ccomorbidades	Morte / sobrevida 28 dias	Morte / sobrevida hospitalar
1	67	Sepse	Pele / sangue	Cocos G (+)			Hepatopatia	Morte	
2	32	Sepse	Cateter	Cocos G (+)			HAS / DM / IRC	Sobrevida	Sobrevida
3	20	Sepse	Amidالية	-				Sobrevida	Sobrevida
4	27	Sepse	ITU	-				Sobrevida	Sobrevida
5	59	Sepse	Pulmão	-			ICC	Sobrevida	Sobrevida
6	53	Sepse	Pulmão	-				Sobrevida	Sobrevida
7	65	Sepse	ITU	-			IRC	Sobrevida	Sobrevida
8	67	Sepse	Pulmão	-			DPOC	Sobrevida	Sobrevida
9	31	Sepse	ITU	-				Sobrevida	Sobrevida
10	19	Sepse	ITU	-				Sobrevida	Sobrevida
11	71	Sepse	ITU	-			HAS / AVC	Sobrevida	Sobrevida
12	43	Sepse	Pulmão	-				Sobrevida	Sobrevida
13	66	Sepse	Pulmão	-			DPOC	Sobrevida	Sobrevida
14	72	Sepse	Pulmão	-			DPOC	Sobrevida	Sobrevida
15		Sepse grave							

16	79	Sepse grave	Pulmão	-	1	1	Parkinson	Sobrevida	Sobrevida
17	49	Sepse grave	Abdome agudo perfurativo	-	4	5	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte
18	57	Sepse grave	Pulmão	-	2	4	HAS / IRC Tx renal	Sobrevida	Sobrevida
19	85	Sepse grave	ITU	-	2		Hepatopatia	Morte	
20	66	Sepse grave	Pulmão	-	3	6		Morte	
21	59	Sepse grave	Pulmão	Acinetobacter	2	5		Morte	
22	78	Sepse grave	Abdome		2	3	HAS / FA crônica	Sobrevida	Sobrevida
23	23	Sepse grave	Pulmão	Acinetobacter Klebsiella	2	3	HAS / IRC / LES	Sobrevida	Sobrevida
24	79	Sepse grave	Pulmão	Cocos G (+)	2	4	AVC / RM	Morte	
25	18	Sepse grave	Períneo	-	5	12		Sobrevida	Sobrevida
26		Sepse grave	Pulmão	-	4	9	HAS / DPOC	Morte	
27	75	Choque	Abdome agudo obstrutivo	-	3	9	HAS / DM / ICC	Sobrevida	Morte
28	46	Choque	Abdome agudo perfurativo	-	4	8		Sobrevida	Sobrevida
29	60	Choque	ITU / Empiema vesicular	-	4	6	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte

30	67	Choque	Sangue	Pseudomonas	3	4	HAS / DM / DAC	Sobrevida	Morte
31	30	Choque	Pulmão / ITU	Enterococo (urina)	2	6		Sobrevida	Sobrevida
32	72	Choque	Abdome		2	7	HAS / IRC	Morte	
33	20	Choque	Pulmão	-	2	4	-	Sobrevida	
34	40	Choque	Sangue / pulmão	Pseudomonas (LBA / sangue)	4	9	AVC	Sobrevida	Sobrevida
35	82	Choque	Sangue / pulmão	E. coli (urina) S. aureus (sangue) Providencia (traqueal)	4	11	HAS / DM / ICo / ICC	Morte	
36	72	Choque	Sangue / pele Pulmão		5	12	Cirrose hepática	Morte	
37	52	Choque		-	3	7	HAS / DM / IRC	Morte	
38	87	Choque	Pulmão	S. coagulase – (sangue) Pseudomonas e Proteus (secr. traqueal)	5	13	HAS / IRC	Morte	
39	48	Choque	Pulmão	-	6	16	-		
40		Choque							
41	59	Choque	Pulmão	Enterobacter e Acinetobacter (secr traqueal)	5	13	HAS / DPOC	Morte	

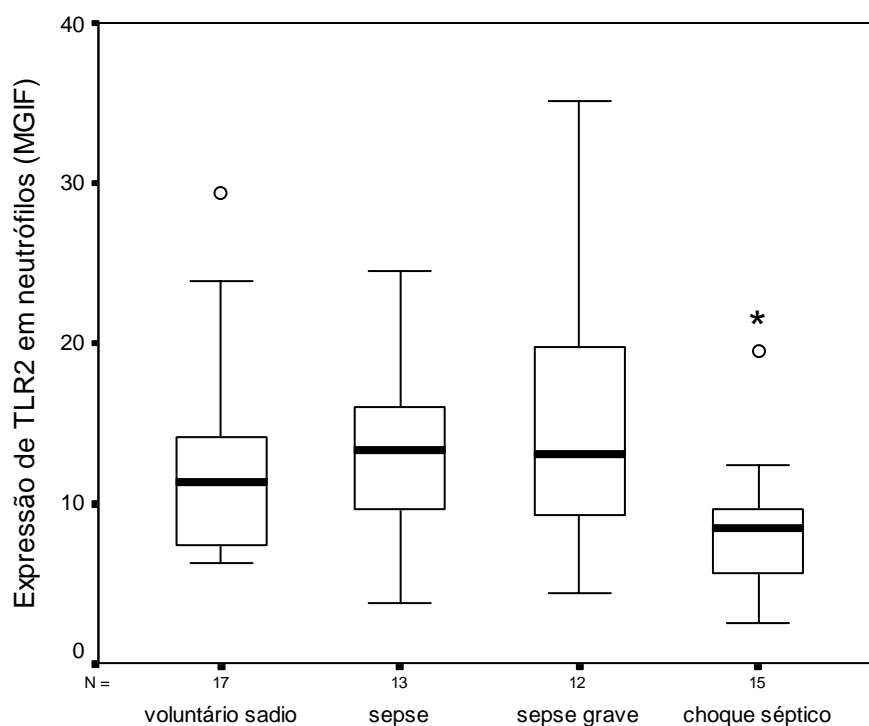


Figura 8: Expressão de TLR2 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes em diferentes estágios da sepse. O número de indivíduos em cada condição está expresso na figura. Os resultados são expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência de TLR2. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

* representa p significativo na comparação entre os grupos utilizando Mann-Whitney. $p=0,05$ na comparação entre o grupo de voluntários saudáveis e choque séptico; $p=0,03$ na comparação entre sepse e choque séptico; $p=0,04$ na comparação entre sepse grave e choque séptico.

○ Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
voluntário sadio	6,2	7,1	11,2	17,5	29,4
sepse	3,7	8,5	13,3	18,9	73,2
sepse grave	4,4	9,1	13,1	21,2	35,2
choque séptico	2,4	5,3	8,4	9,8	29,1

Tabela 8: Expressão de TLR2 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes em diferentes estágios da sepse. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

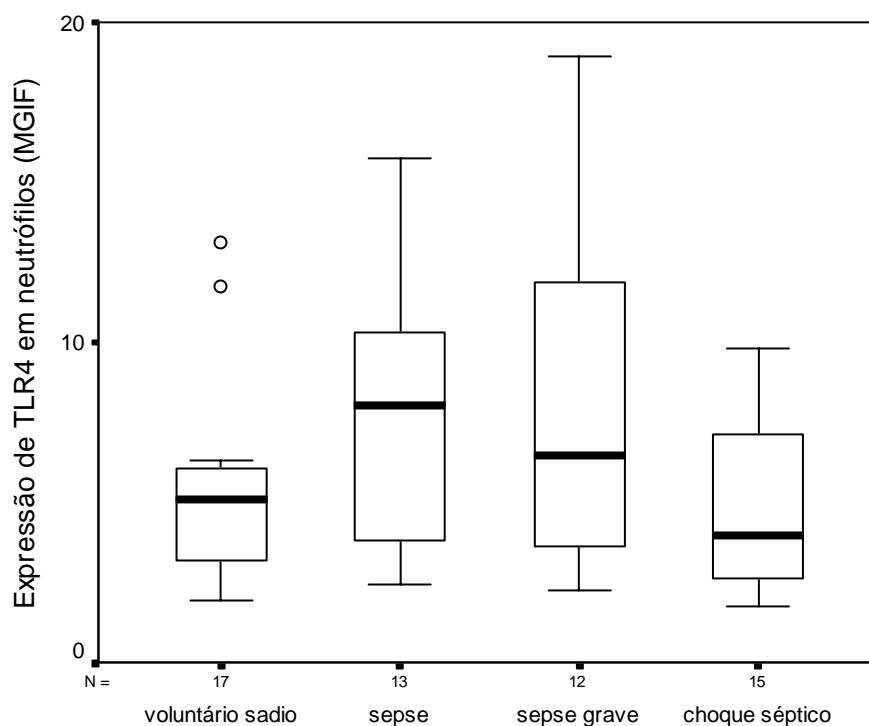


Figura 9: Expressão de TLR4 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. O numero de indivíduos em cada condição esta expresso na figura. Os resultados são expressos em media geométrica da intensidade de fluorescência de TLR4. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

p=0,297 (Kruskal-Wallis)

° Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
voluntário sadio	2,0	3,1	5,1	6,2	19,3
sepse	2,5	3,7	8,0	10,9	15,8
sepse grave	2,3	3,6	6,5	13,0	18,9
choque séptico	1,7	2,6	4,0	7,3	21,4

Tabela 9: Expressão de TLR4 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

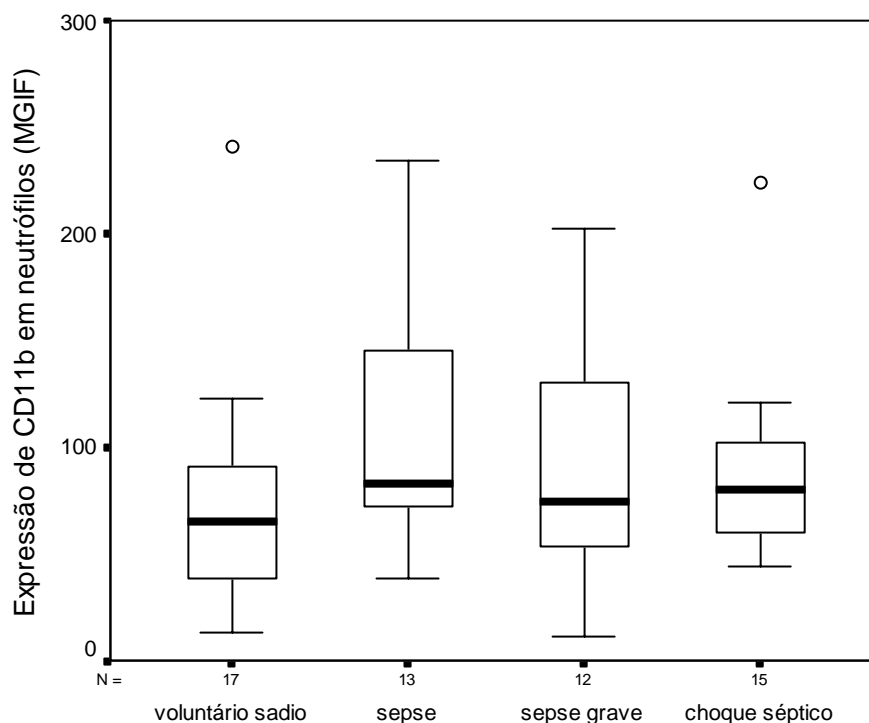


Figura 10: Expressão de CD11b em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. O numero de indivíduos em cada condição esta expresso na figura. Os resultados são expressos em media geométrica da intensidade de fluorescência de CD11b. Os boxplot representam a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

p=0,448 (Kruskal-Wallis)

° Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
voluntário sadio	12,9	34,6	65,4	98,1	240,7
sepse	38,0	62,9	83,3	151,6	234,1
sepse grave	10,8	52,4	74,1	144,5	202,6
choque séptico	44,1	58,0	80,6	102,8	224,2

Tabela 10: Expressão de CD11b em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

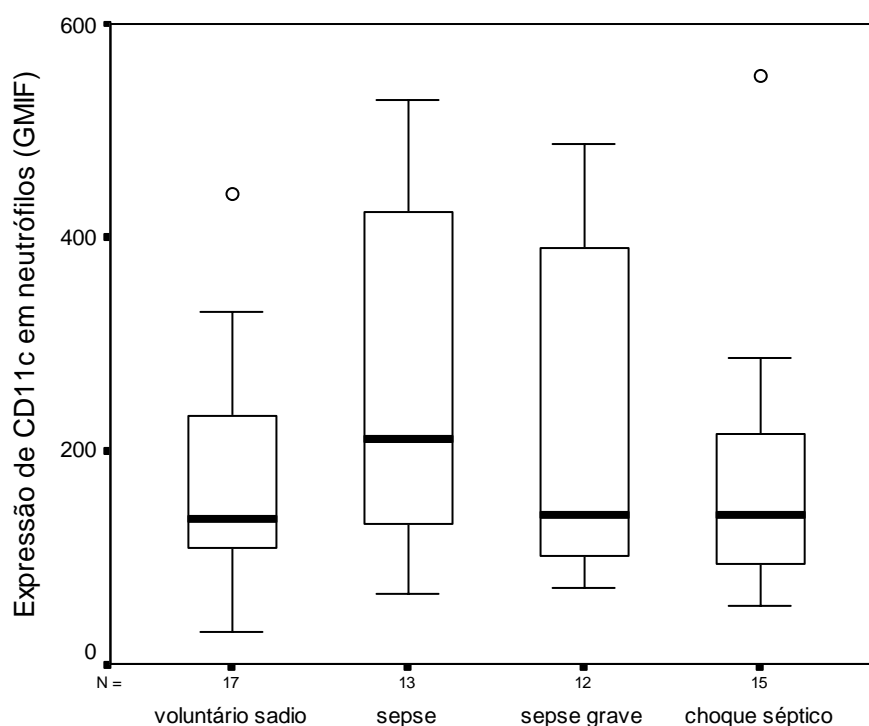


Figura 11: Expressão de CD11c em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. O numero de indivíduos em cada condição esta expresso na figura. Os resultados são expressos em media geométrica da intensidade de fluorescência de CD11c. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

p=0,340 (Kruskal-Wallis)

° Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
voluntário sadio	29,7	107,8	135,2	280,7	1132,3
sepse	66,3	127,7	210,1	443,4	1269,5
sepse grave	71,7	98,5	139,4	411,6	968,6
choque séptico	55,2	90,4	140,4	229,6	550,8

Tabela 11: Expressão de CD11c em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

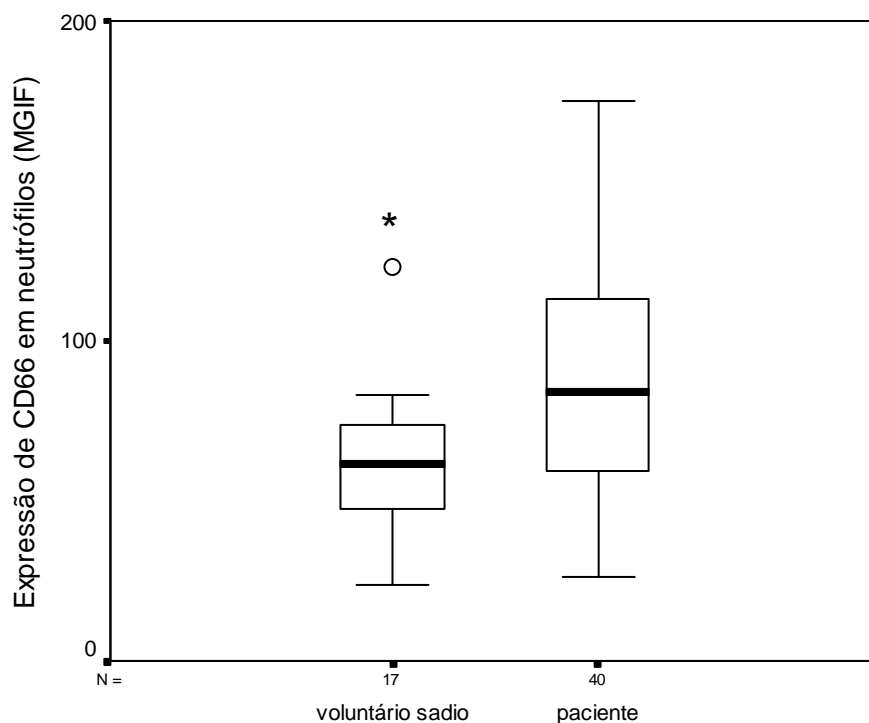


Figura 12: Expressão de CD66 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes sépticos. O numero de indivíduos em cada condição esta expresso na figura. Os resultados são expressos em media geométrica da intensidade de fluorescência de CD66. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

* representa $p=0,01$ na comparação entre os grupos utilizando Mann-Whitney.

○ Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
<i>voluntário sadio</i>	23,9	43,2	61,6	74,5	123,1
<i>paciente séptico</i>	26,0	59,1	84,1	113,3	175,3

Tabela 12: Expressão de CD66 em neutrófilos de indivíduos sadios e de pacientes sépticos. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

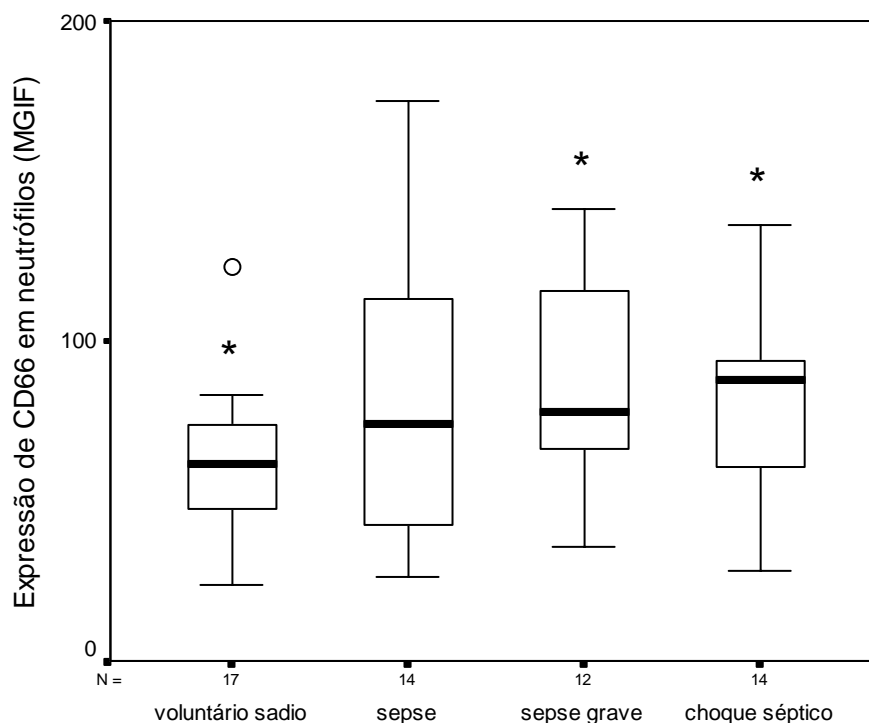


Figura 13: Expressão de CD66 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. O numero de indivíduos em cada condição esta expresso na figura. Os resultados são expressos em media geométrica da intensidade de fluorescência de CD66. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

* representa $p=0,02$ na comparação entre o grupo de voluntários sadios e de sepse grave e $p=0,01$ entre voluntários sadios e choque séptico (Mann-Whitney)

° Valores extremos

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
voluntário sadio	23,9	43,2	61,6	74,5	123,1
sepse	26,0	42,0	73,8	113,9	175,3
sepse grave	35,9	65,4	78,1	118,4	140,9
choque séptico	27,8	60,2	87,6	100,3	136,1

Tabela 13: Expressão de CD66 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

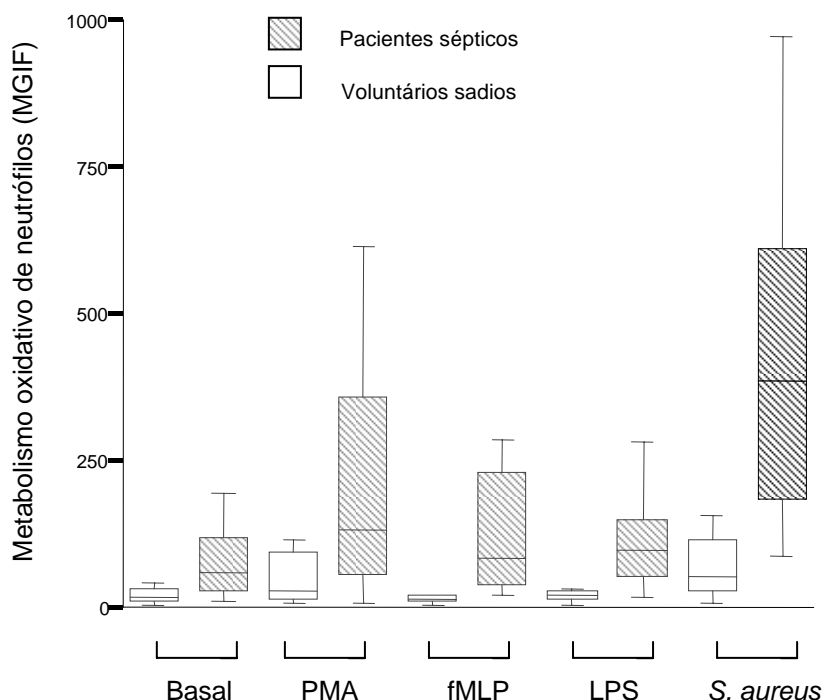


Figura 14: Metabolismo oxidativo de neutrófilos de indivíduos sadios e pacientes sépticos em sangue total. Estão representadas as condições basal, isto é, sem estímulo, e após estímulo com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*, respectivamente. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de voluntários sadios e pacientes sépticos na condição basal e frente aos diversos estímulos. $p < 0,001$ em todas as condições (Mann-Whitney).

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
Basal sadio	8,0	9,7	14,9	19,4	77,0
Basal paciente	17,0	37,2	55,9	116,1	167,9
PMA sadio	11,2	13,6	28,5	101,7	487,4
PMA paciente	31,7	45,7	59,6	227,6	1630,1
fMLP sadio	1,8	5,4	10,5	17,8	142,0
fMLP paciente	19,5	35,2	102,6	232,5	584,3
LPS sadio	1,8	11,4	18,6	24,0	63,3
LPS paciente	46,2	55,9	103,9	198,0	343,5
<i>S. aureus</i> sadio	24,9	29,9	48,1	113,9	155,0
<i>S. aureus</i> paciente	93,3	197,2	419,2	529,0	1356,2

Tabela 14: Metabolismo oxidativo de neutrófilos de voluntários sadios e pacientes sépticos. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

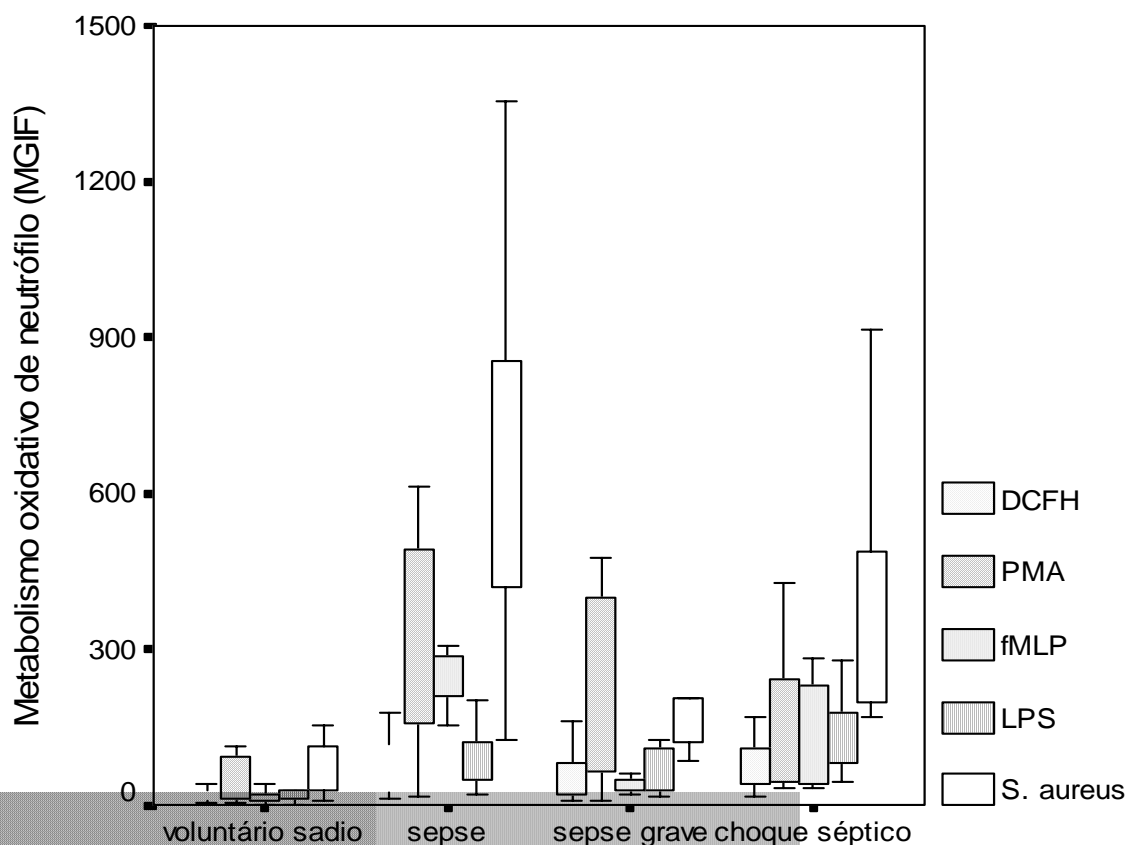


Figura 15: Metabolismo oxidativo de neutrófilos de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão representadas as condições basal, isto é, sem estímulo, e após estímulo com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*, respectivamente. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

O valor de p resultante das comparações entre as diferentes condições entre os grupos (Mann-Whitney) está expresso na tabela 14 abaixo:

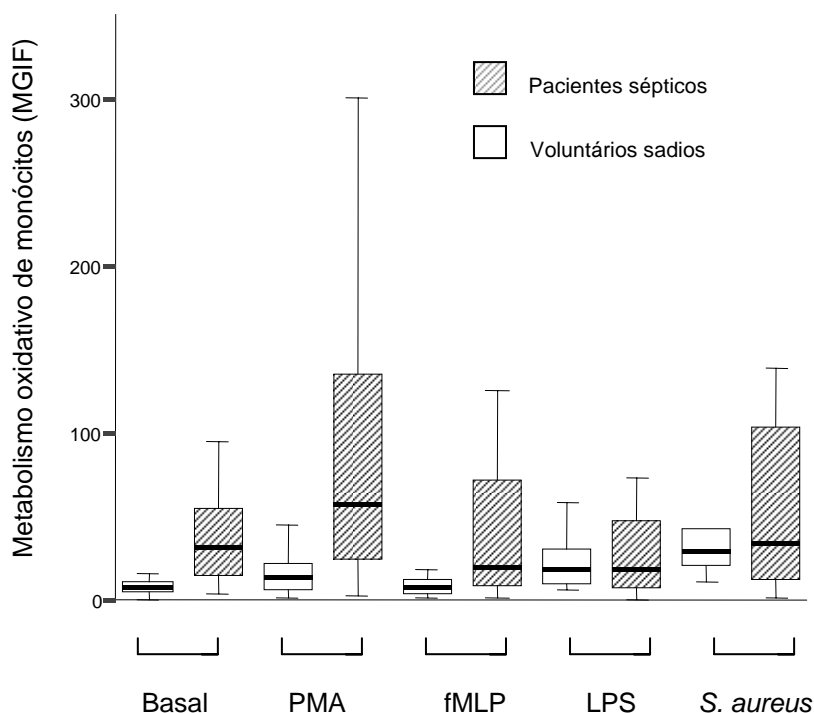


Figura 16: Metabolismo oxidativo de monócitos de indivíduos sadios e pacientes sépticos em sangue total. Estão representadas as condições basal, isto é, sem estímulo, e após estímulo com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*, respectivamente. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de voluntários sadios e pacientes sépticos na condição basal e frente aos diversos estímulos. $p < 0,001$ em todas as condições, exceto frente ao estímulo com fMLP cujo valor de $p = 0,04$ (Mann-Whitney).

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
Basal sadio	3,7	5,5	8,3	14,5	32,1
Basal paciente	11,7	15,6	32,6	72,5	130,5
PMA sadio	5,7	7,2	14,5	39,7	63,0
PMA paciente	3,4	22,7	44,3	87,0	375,9
fMLP sadio	1,5	3,6	5,4	8,5	51,9
fMLP paciente	1,3	8,5	15,6	59,4	183,4
LPS sadio	1,4	5,3	8,6	10,4	25,0
LPS paciente	1,5	20,7	41,2	73,7	116,6
<i>S. aureus</i> sadio	9,7	10,4	15,4	27,8	31,4
<i>S. aureus</i> paciente	26,4	42,1	79,4	190,8	322,9

Tabela 16: Metabolismo oxidativo de monócitos de voluntários sadios e pacientes sépticos. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

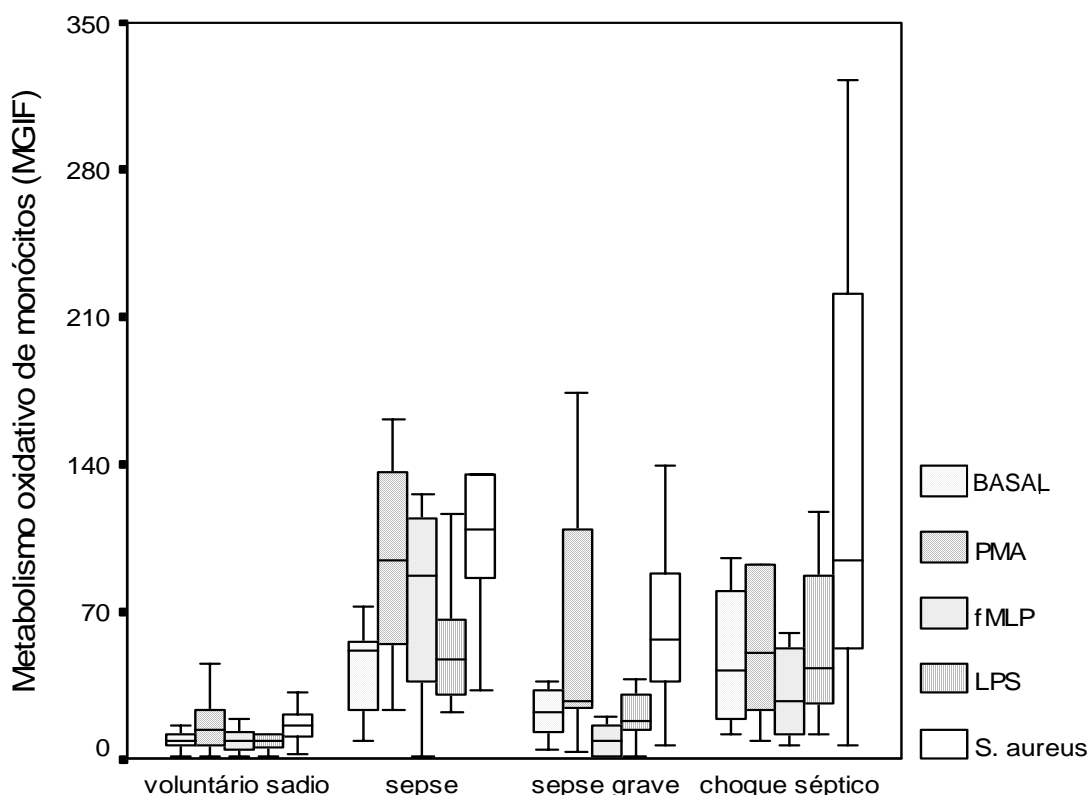
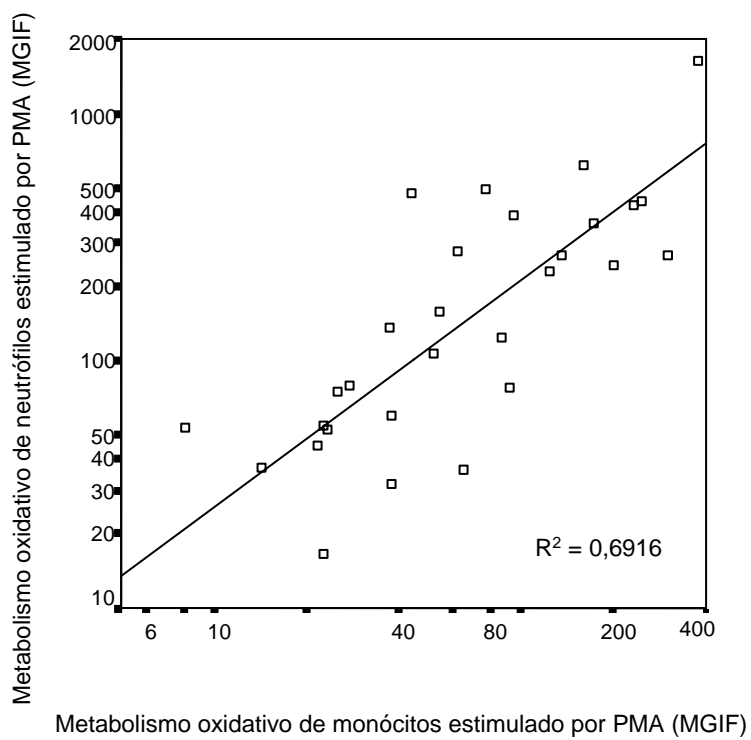
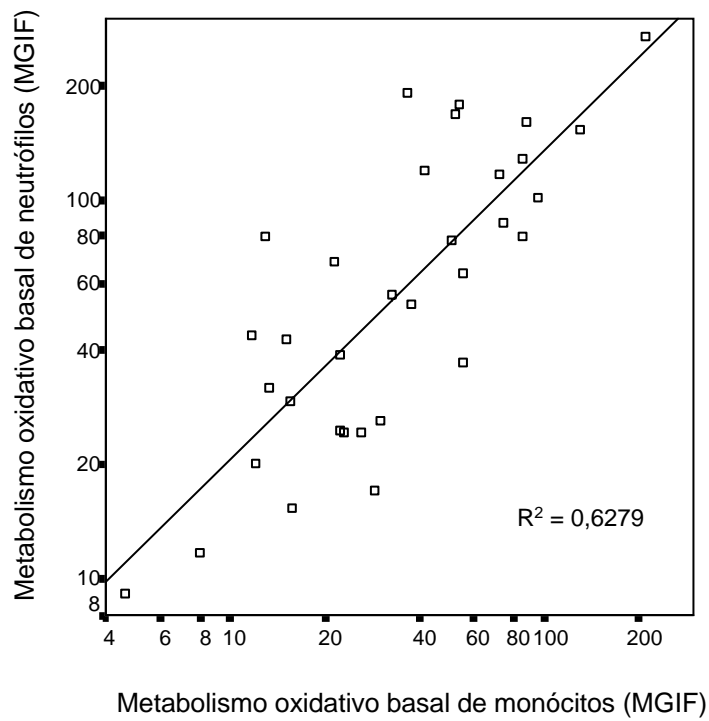


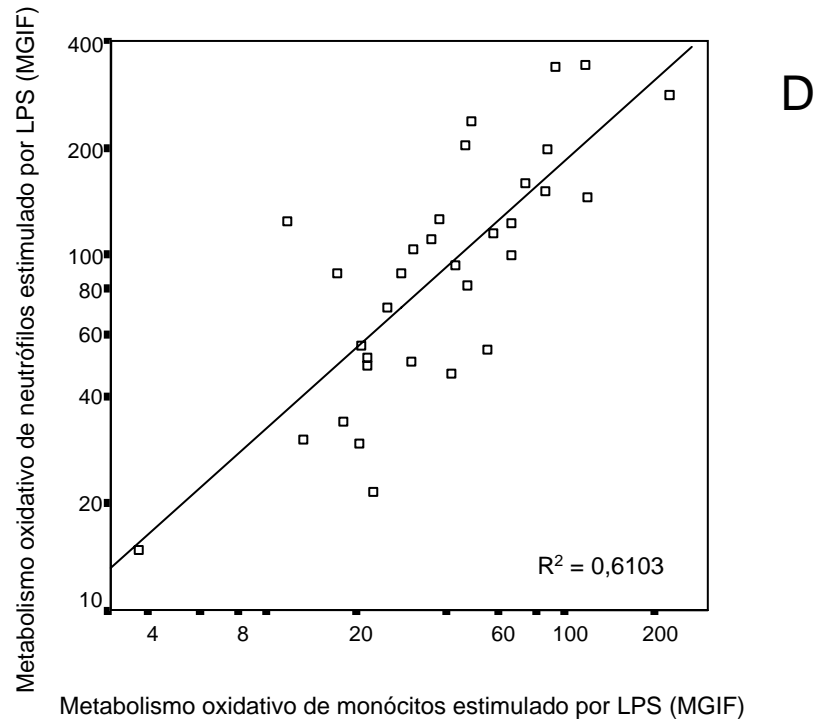
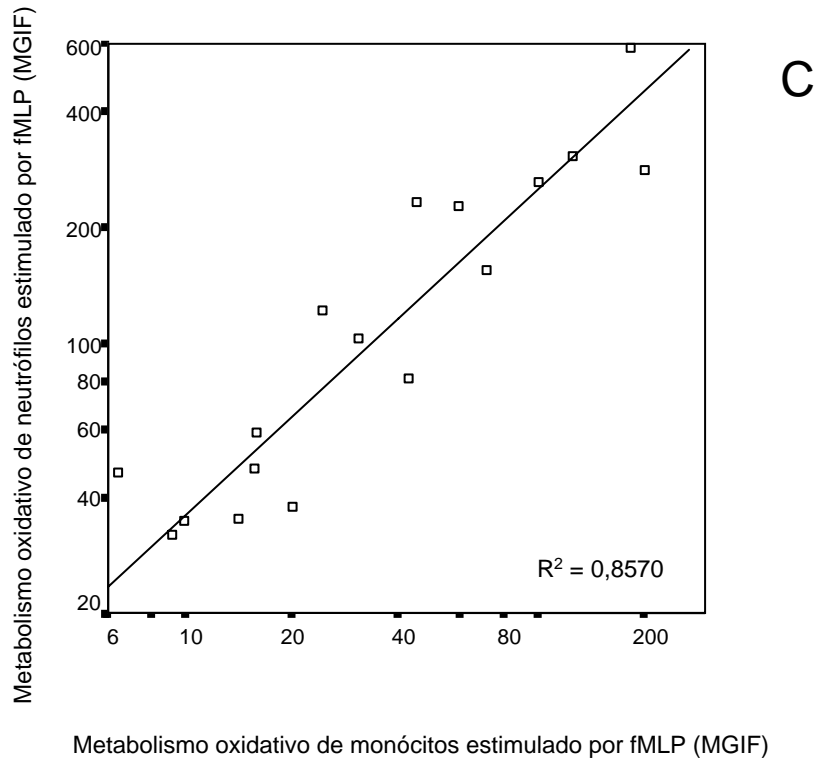
Figura 17: Metabolismo oxidativo de monócitos de indivíduos sadios e de pacientes em diferentes estadios da sepse. Estão representadas as condições basal, isto é, sem estímulo, e após estímulo com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus*, respectivamente. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

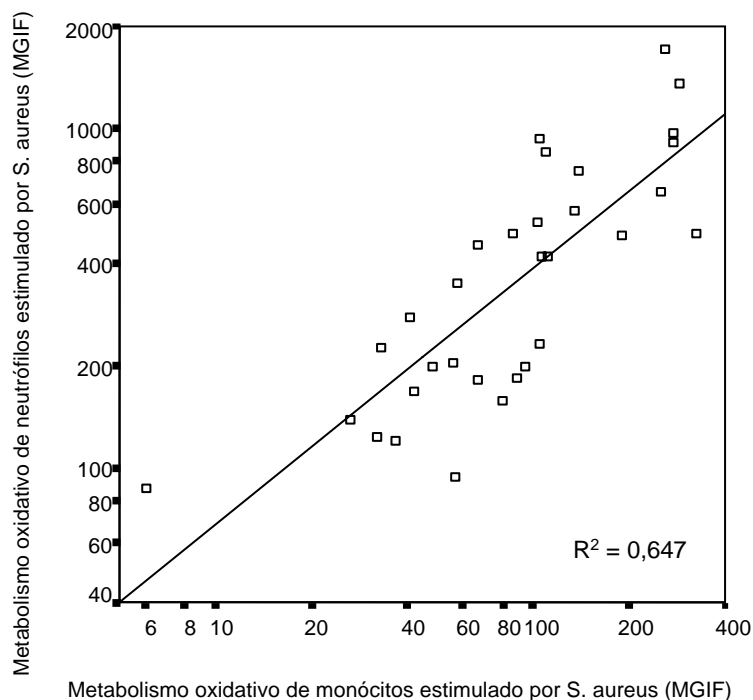
O valor de p resultante das comparações entre as diferentes condições entre os grupos (Mann-Whitney) está expresso na tabela 16 abaixo:

	Basal	PMA	fMLP	LPS	<i>S. aureus</i>
Sadio x Sepse	0,001	0,001	0,177	0,0001	0,0001
Sadio x sepse grave	0,01	0,115	0,961	0,06	0,001
Sadio x choque séptico	0,0001	0,009	0,007	0,0001	0,0001
Sepse x sepse grave	0,136	0,252	0,171	0,01	0,113
Sepse x choque séptico	0,953	0,201	0,521	0,953	0,770
Sepse grave x choque séptico	0,123	0,689	0,032	0,008	0,115

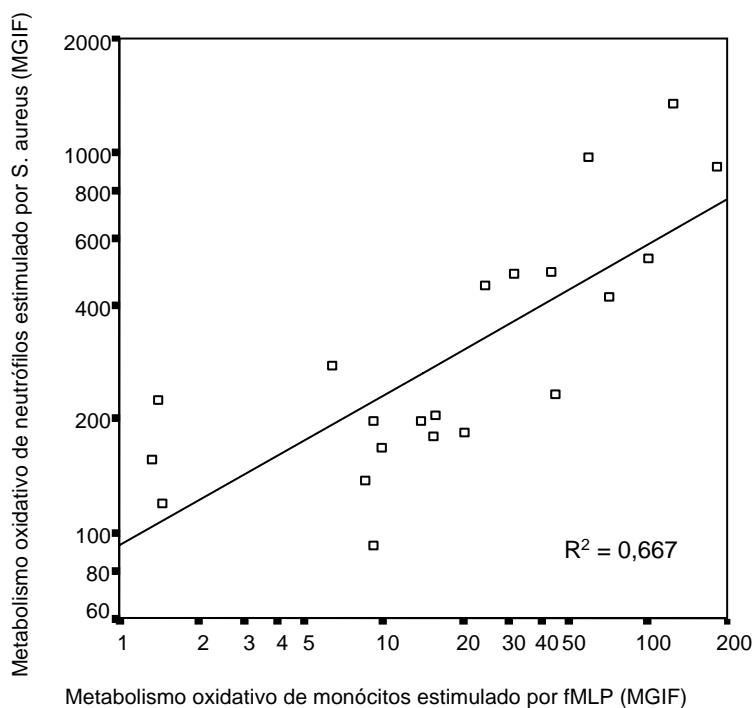
Tabela 17: Valor de p resultante das comparações entre as diferentes condições entre os grupos (Mann-Whitney)







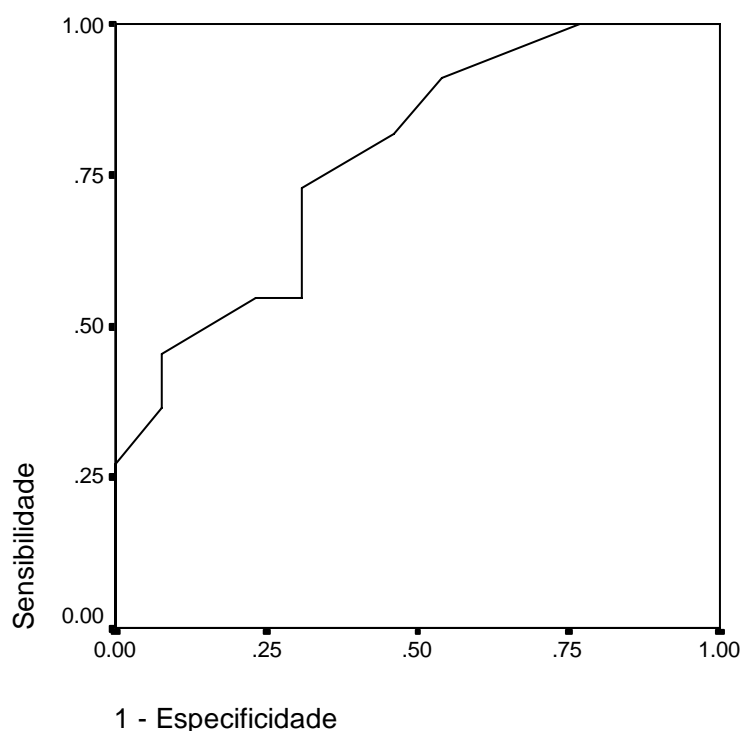
E



F

Figura 18: As figuras A, B, C, D, E e F representam as correlações entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e de monócitos nas condições em que o R^2 (R ao quadrado) é maior que 0,60. Estão representadas as correlações na condição basal (A) e após estímulo com PMA (B), fMLP (C), LPS (D), *S. aureus* (E) e *S. aureus* x fMLP (F).

A linha reta representa a correlação.



Área	Erro padrão	p	IC 95%	
			Mínimo	Máximo
.780	.094	.020	.596	.964

sobrevida / óbito SOFA	Óbito	Sobrevida	Total
SOFA ≥ 7	8	≥4	12
SOFA < 7	3	9	12
Total	11	13	24

RR = 2,67

Quadro 3: Área sob curva do grupo de sepse grave e choque séptico com SOFA e mortalidade de 28 dias foi de 0,72 ($p=0,02$). A partir do ponto de melhor sensibilidade e especificidade do teste foi determinado o ponto de corte de 7 e então calculado o risco relativo (RR) que foi de 2,67 com IC de 95% de 0,93 a 7,69. A sensibilidade foi de 72% e a especificidade foi de 70%

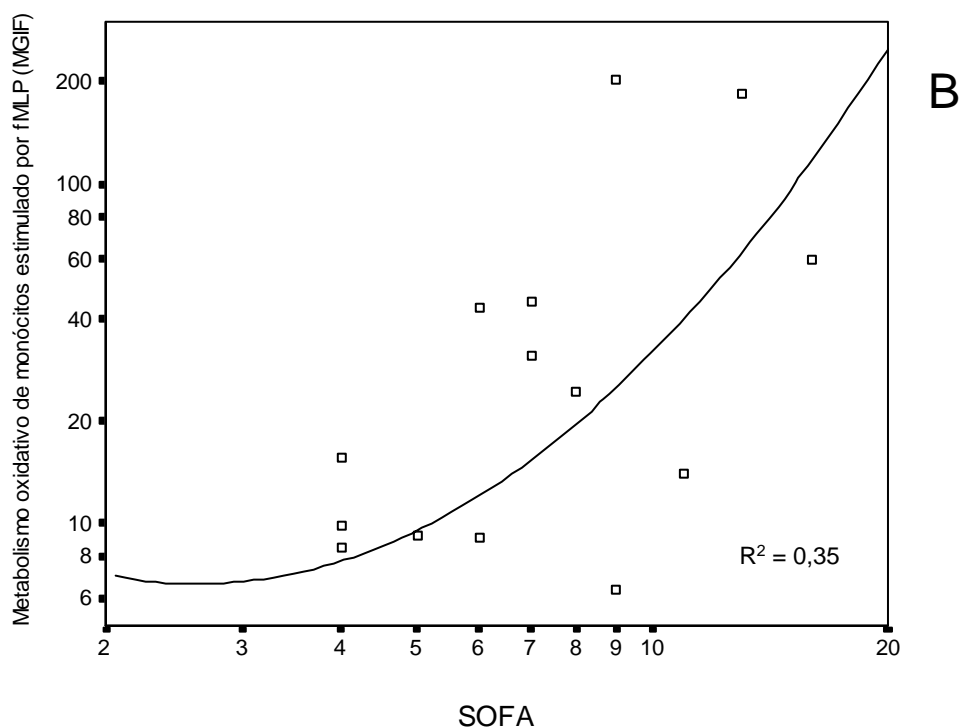
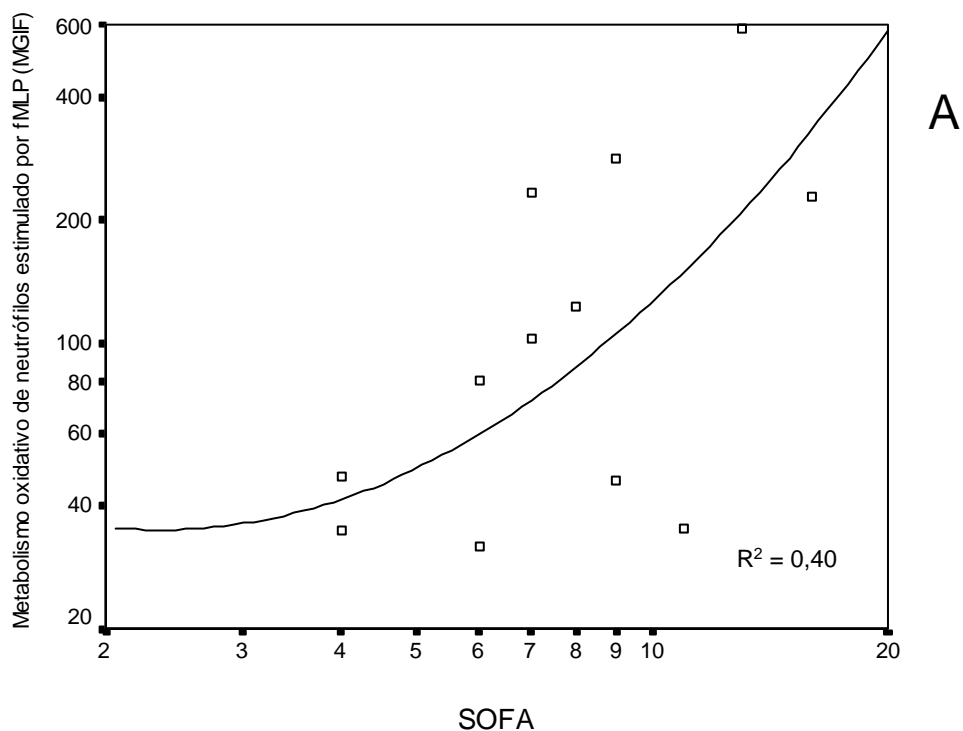


Figura 19: As figuras representam as correlações entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos (A) e de monócitos (B) estimulado por fMLP. A correlação quadrática foi a que melhor se adaptou ao modelo e observa-se que a partir de um SOFA de 7 há um aumento praticamente linear do metabolismo oxidativo em ambos os gráficos. Também estão representados os R ao quadrado de ambas condições.

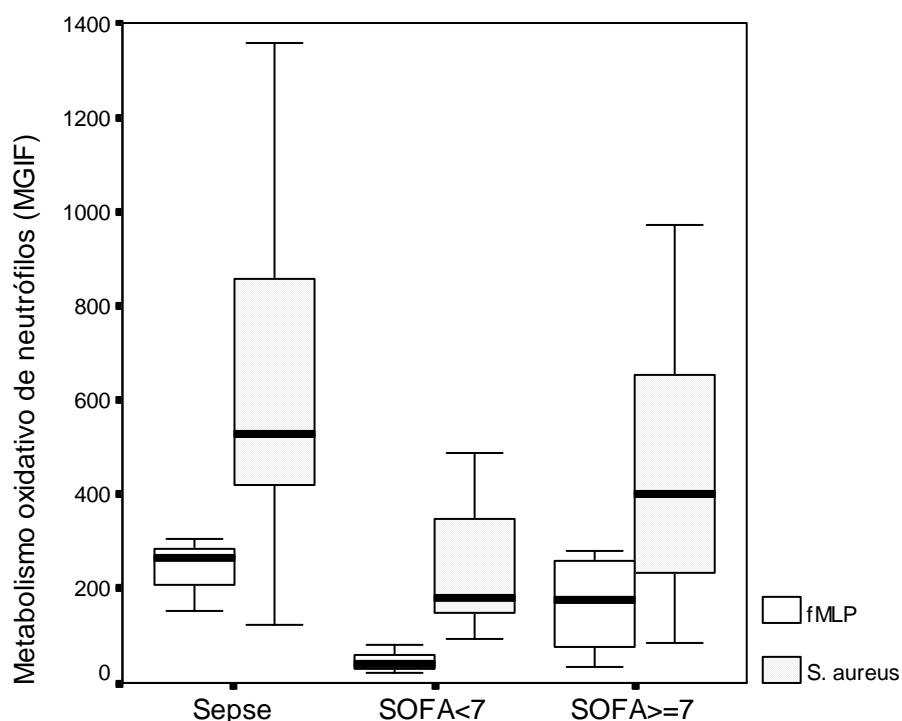


Figura 20: Metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulado por fMLP (caixa em branco) e por *S. aureus* (caixa listrada). Os resultados são expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência. Estão representados a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores máximos e mínimos.

No grupo representando estímulo por fMLP, $p=0,02$ na comparação entre o grupo de sepse e SOFA<7; $p=0,02$ na comparação entre SOFA<7 e SOFA 7. No grupo representando estímulo por *S. aureus*, $p=0,03$ na comparação entre o grupo de sepse e SOFA<7

	mínimo	25%	mediana	75%	máximo
fMLP neutrófilo Sepse	154,3	154,3	263,4	284,7	306,1
fMLP neutrófilo SOFA<7	19,5	28,7	40,9	64,3	80,8
fMLP neutrófilo SOFA 7	35,2	46,2	122	232,5	584,3
S. aureus neutrófilo Sepse					
S. aureus neutrófilo SOFA<7	419,2	419,2	529	942,6	1356
S. aureus neutrófilo SOFA 7	93,3	149	189	275,5	488,3
	197,2	231,3	451,4	915,7	972,1

Tabela 19: Metabolismo oxidativo de neutrófilos após estímulo com fMLP e *S. aureus* nos grupos de pacientes com sepse, SOFA<7 e SOFA 7. Estão expressos os valores de mediana, percentis 25% e 75% e valores máximo e mínimo de cada grupo.

DISCUSSÃO

O presente estudo procurou demonstrar o estado de ativação de neutrófilos e de monócitos durante o *continuum* das manifestações da sepse e correlacioná-lo com disfunção de órgãos. Para tanto, foi avaliada a expressão de receptores de superfície, aqui compreendendo o TLR2, TLR4, CD11b, CD11c e CD66b, em neutrófilos, além do metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos com ou sem estímulos.

Assim, foram considerados 41 pacientes com diagnóstico clínico laboratorial de sepse, sepse grave e choque séptico, classificados de acordo com o consenso de 1992 (BONE, SIBBALD et al., 1992) e modificado em 2001 (LEVY, FINK et al., 2003). Ressaltamos que são vastos os estudos em literatura médica avaliando o estado de ativação celular em pacientes com sepse grave e choque séptico, entretanto poucos o descrevem na sepse.

Foram feitas comparações primeiramente do grupo de pacientes como um todo e o grupo de voluntários sadios, e depois dos diversos grupos entre si. A avaliação de disfunção de órgãos foi realizada nos grupos de sepse grave e choque séptico.

Para avaliar disfunção orgânica utilizamos o SOFA (VINCENT, BIHARI et al., 1995). O uso do SOFA como descritor de disfunção de órgãos foi validado em outros estudos tais como de Ferreira e colaboradores (FERREIRA, BOTA et al., 2001) que avaliando 352 pacientes consecutivamente admitidos em UTI, encontraram uma discriminação muito boa entre sobreviventes e não sobreviventes (curva ROC 0,88), sendo que os pacientes que tinham SOFA > 11 à admissão tiveram taxa de mortalidade de 91%. Também em trabalho recente de Kai (KAI, 2003) (manuscrito em preparação) o SOFA foi capaz de discriminar os sobreviventes dos não

sobreviventes numa população de 56 pacientes com choque séptico (Curva ROC 0,74). Pacientes com SOFA >10 no primeiro dia de admissão na UTI apresentaram mortalidade de 66% com RR de 2,27 (IC 95% 1,28 - 4,03).

Em nosso estudo, foi observado que o SOFA foi capaz de discriminar entre sobreviventes e não sobreviventes no primeiro dia de admissão na UTI, que coincidiu com o dia da coleta do sangue para realização dos ensaios. Pacientes com SOFA maior ou igual a sete (12 num total de 24, sendo 10 com choque séptico) apresentaram mortalidade de 66,6% contra 25% no grupo de pacientes com SOFA <7. A curva ROC obtida foi de 0,78 e o RR de 2,67 (IC de 95% 0,93 – 7,69), ou seja, pacientes com SOFA maior ou igual a 7 tiveram 2,67 vezes mais chance de morrer que aqueles pacientes com SOFA menor que 7.

Além da medida de disfunção de órgãos, foi considerada mortalidade de 28 dias. Embora haja críticas a respeito do uso dessa medida, optamos por utilizá-la, pois achamos que assim seria possível eliminar, pelo menos em parte, outras variáveis que poderiam estar envolvidas de forma indireta na mortalidade dos pacientes. Nas enfermarias, por exemplo, pacientes traqueostomizados são aspirados com uma frequência bem menor que aquela observada em UTI. Inclusive, recentemente foi colocado em discussão que os intensivistas deveriam continuar acompanhando os pacientes com alto risco de morte que recebem alta para enfermarias (AZOULAY, ALBERTI et al., 2005).

Em relação à ativação de receptores de superfície celular, a expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos e monócitos durante a sepse tem sido objeto de interesse crescente já que esses receptores são, respectivamente, os

responsáveis pelo reconhecimento de produtos de patógenos gram-positivos e gram-negativos, de tal forma que camundongos com deficiência de TLR2 são altamente suscetíveis a infecções por *S. aureus* (TAKEUCHI, HOSHINO et al., 2000) e em camundongos tolerantes a endotoxina existe diminuição da expressão de TLR4 (NOMURA, AKASHI et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram que houve expressão significativamente menor de TLR2 na superfície de neutrófilos no grupo de pacientes com choque séptico em relação aos demais grupos, isto é, sadios, sepse e sepse grave.

Em relação à expressão de TLR4, embora não tenhamos observado diferença significativa, houve uma tendência de diminuição de sua expressão também no grupo de pacientes com choque séptico comparado ao grupo de sepse ($p=0,06$).

Há vários estudos mostrando que TLR2 e TLR4 estão expressos na superfície de neutrófilos de indivíduos sadios e essa expressão aumenta quando os neutrófilos são estimulados, por exemplo, com LPS (SABROE, JONES et al., 2002) ou com GM-CSF (KURT-JONES, MANDELL et al., 2002), considerando-se que neste ultimo caso, o aumento é observado principalmente em relação à expressão de TLR2. Em estudo de expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos de pacientes com sepse e sepse grave, também foi demonstrado aumento significativo da expressão de ambos receptores comparados a indivíduos sadios, sem a utilização de estímulo (HARTER, MICA et al., 2004).

Nosso estudo é o primeiro a analisar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 na sepse humana em sangue total utilizando duas marcações de

superfície para discriminar populações celulares combinada ao tamanho e complexidade celular. Esta análise foi possível devido à utilização simultânea dos anticorpos CD66b e CD14, que resultaram em nítida separação das populações de neutrófilos e monócitos, respectivamente. O emprego do sangue total na imunofenotipagem retrata com fidelidade a expressão dos receptores de superfície porque exclui a possibilidade de alterações causadas pela separação de células por gradiente de densidade, como ficoll, ou procedimentos de adesão (ERTEL, KROMBACH et al., 1993). Assim sendo, acreditamos ser improvável que qualquer discrepância encontrada com a literatura médica seja decorrente da técnica utilizada.

Isso nos faz conjecturar se o que estamos observando não seria então uma forma de tolerância de neutrófilos neste grupo específico de doentes com choque séptico, semelhante ao que tem sido observado em monócitos, muito embora nosso grupo não tenha demonstrado tal fenômeno em relação à expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos de pacientes sépticos (manuscrito em preparação). Talvez possa ser uma forma de reprogramação (e não anergia) da ativação dos neutrófilos nesta condição. O mesmo foi observado pelo grupo de Parker e colaboradores que encontraram um fenômeno de tolerância em neutrófilos previamente estimulados com LPS (PARKER, JONES et al., 2004).

Observamos correlação entre expressão de TLR2 e metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos estimulado por PMA e *S. aureus*. Encontramos dois estudos que mostraram associação entre TLR4 e produção de ERO em neutrófilos e linhagem de células monocíticas humanas (PARK, JUNG et al., 2004; REMER, BRCIC et al., 2003). Não foram encontrados

estudos clínicos. A correlação por nós encontrada entre expressão de TLR-2 e metabolismo induzido por *S. aureus* poderia sugerir importante papel regulador da modulação da expressão de TLR-2 no metabolismo oxidativo em pacientes com sepse. Todavia, o fato da mesma correlação ter sido encontrada com PMA, que atua de forma independente da expressão de receptores de membrana, diretamente sobre a PKC, mostra que tal associação precisa ser interpretada com cautela. O fato de não observarmos correlação entre TLR4 e metabolismo induzido por LPS é um dado a mais mostrando a fragilidade do efeito que a modulação da expressão de receptores na superfície de neutrófilos tem na resposta aos diferentes estímulos na produção de espécies reativas de oxigênio, no caso, principalmente H₂O₂ medido pelo método do DCFH.

Observamos que não houve correlação da expressão de TLR2 e TLR4 com disfunção de órgãos mas houve tendência de a expressão de TLR2 ser menor no grupo de SOFA ≥ 7 do que no grupo com SOFA <7 ($p=0,08$). Isso pode ser explicado pelo fato do grupo de maior gravidade (SOFA ≥ 7) ser composto na sua maioria por pacientes com choque séptico que, por sua vez, demonstraram expressão menor de TLR2. Não encontramos estudos de associação entre expressão de TLRs e disfunção de órgãos.

Além disso, encontramos correlação entre a expressão de CD11b e TLR4 ($R=0,44$; $p=0,004$) (esses dados não foram mostrados em resultados). Sabroe e colaboradores (SABROE, JONES, et al., 2002) também mostraram aumento da expressão de TLR4 e de CD11b e diminuição da expressão de selectinas em neutrófilos purificados de indivíduos sadios estimulados por LPS. Em outro estudo do mesmo grupo, os achados anteriores foram

confirmados e, além disso, foi observado aumento da produção de ERO em neutrófilos após estímulo com fMLP (SABROE, PRINCE et al., 2003). Hayashi e colaboradores (HAYASHI, MEANS et al., 2003) em estudo avaliando a estimulação de neutrófilos de indivíduos sadios pelos TLRs, também encontraram aumento da produção de ERO após estímulo com fMLP, mas ao contrário dos estudos anteriores evidenciaram aumento da expressão de selectinas.

Aumento na expressão de CD11b em neutrófilos e monócitos é considerado um bom marcador de ativação celular. Entretanto, em nosso estudo, não encontramos diferença na expressão de CD11b entre os grupos considerados, nem mesmo podemos dizer que exista tendência desta estar aumentada em uma ou outra situação. Também não encontramos correlação entre a expressão de CD11b e SOFA. Nossos achados estão em acordo àqueles de Russwurm e colaboradores (RUSSWURM, VICKERS et al., 2002), onde também não foi observada diferença entre expressão de CD11b entre pacientes com sepse, choque séptico e voluntários sadios. Ainda, em estudo de Jimenez e colaboradores, também não se observou aumento significativo da expressão de CD11b em pacientes com SRIS comparado a indivíduos sadios, embora tenha sido considerado um número pequeno de doentes (JIMENEZ, WATSON et al., 1997).

Por outro lado, Muller Kobold e colaboradores demonstraram aumento da expressão de CD11b em pacientes com choque séptico comparado ao grupo de voluntários sadios. Além disso, analisando o grupo de pacientes em relação à sobrevida, a expressão de CD11b foi significativamente menor no grupo de não sobreviventes ($p=0,05$) (MULLER KOBOLD, TULLEKEN et al.,

2000). Porém, em estudo recente, o aumento significativo da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos de pacientes com choque séptico em relação aos voluntários sadios não esteve correlacionado com a mortalidade (CHISHTI, SHENTON et al., 2004).

Outro receptor do grupo das integrinas analisado foi CD11c. Em nosso estudo não foi observada diferença significativa da expressão de CD11c entre os grupos considerados. Porém, observa-se uma tendência da expressão de CD11c ser maior no grupo de sepse comparado aos grupos de voluntários sadios e de choque séptico. Não foi encontrada correlação entre expressão de CD11c e SOFA.

Existem poucos estudos que relatam a medida da expressão de CD11c em neutrófilos de pacientes sépticos. Drossou-Agakidou (DROSSOU-AGAKIDOU, KANAKOUDI-TSAKALIDOU et al., 1998) encontraram expressão diminuída, embora não significativa, de CD11c em neonatos com choque séptico comparados a neonatos sadios. Na mesma direção, porém em população celular diferente, monócitos, também foi encontrada diminuição da expressão de CD11c em pacientes com choque séptico comparados a indivíduos sadios (WILLIAMS, WHITE et al., 1998).

Dessa forma, ainda são controversos os resultados em relação à expressão de CD11b e CD11c na sepse, bem como sua relação com prognóstico. Pode ser que essa variabilidade de resultados esteja relacionada à não detecção desses receptores por limitação técnica. O CD11b, por exemplo, não é apenas um marcador de ativação leucocitária; também está envolvido na adesão dos neutrófilos e monócitos a células endoteliais, (MEERSCHAERT e FURIE, 1995) e dessa forma, pode ser que leucócitos

que possuam expressão elevada de CD11b sejam rapidamente seqüestrados da circulação e dessa forma não são detectados em amostras de sangue (RUSSWURM, VICKERS, et al., 2002).

Em relação à expressão de CD66b, encontramos um aumento significativo da expressão de CD66b em neutrófilos do grupo de pacientes comparado ao grupo de sadios. Analisando individualmente os grupos, também encontramos expressão significativamente maior nos grupos de pacientes com sepse grave e choque séptico em comparação aos indivíduos sadios. Não encontramos associação entre expressão de CD66b e disfunção de órgãos.

Em estudo de ativação leucocitária, Muller Kobold e colaboradores, 2000, também evidenciaram aumento da expressão de CD66b em paciente com choque séptico comparado a indivíduos sadios (MULLER KOBOLD, TULLEKEN, et al., 2000). Também foi observado aumento da expressão de CD66b em indivíduos sadios após injeção de 4ng/Kg de peso de LPS (KANEKO, STEARNS-KUROSAWA et al., 2003).

Observa-se que os estudos em relação à expressão de CD66b como marcador de ativação de neutrófilos na sepse também são limitados, estando mais direcionados à correlação deste com a ativação de NADPH oxidase e conseqüente estresse oxidativo, como foi previamente demonstrado (FEUK-LAGERSTEDT, JORDAN et al., 1999; WITTMANN, ROTHE et al., 2004).

Na análise do metabolismo oxidativo de neutrófilos foram feitas comparações primeiramente do conjunto de pacientes e o grupo de voluntários sadios, e depois dos diversos grupos entre si. Encontramos maior produção de ERO na condição basal, isto é, sem estímulo, no grupo de

pacientes quando comparado ao grupo controle. Este achado reflete, portanto, o aumento da produção de ERO desencadeada pelo próprio evento infeccioso nos pacientes. Com os demais estímulos, PMA, FMLP, LPS e *S. aureus*, também houve produção significativamente maior de ERO no grupo de pacientes sépticos. Em ambos os grupos, esse aumento manteve as mesmas proporções em relação à produção basal, conforme foi apresentado nos resultados.

Quando os grupos de pacientes – com sepse, sepse grave e choque séptico - foram analisados em relação ao grupo de voluntários sadios, houve aumento da produção de ERO em todos os grupos de pacientes na condição basal e após estímulos com LPS e *S. aureus*. Entretanto, após estímulos com PMA e fMLP, houve incremento na produção de ERO no grupo de sepse e de choque séptico, porém isso não foi observado no grupo de sepse grave. Pode ser que o fato de não ter havido incremento na produção de ERO após estímulos com PMA e fMLP no grupo de sepse grave deva-se ao fato que eles possuem diferentes vias de ativação. O fMLP liga-se a receptores específicos nos neutrófilos e ativa várias funções como quimiotaxia, agregação e produção de ERO (TSCHAIKOWSKY, SITTL et al., 1993). O PMA é um ativador potente de oxidase e induz a produção de ERO diretamente através da ativação de proteína C quinase, isto é, independe de receptores (LUNDQVIST, FOLLIN et al., 1996). LPS e *S. aureus* por sua vez, têm receptores com maior especificidade.

Na comparação dos grupos de pacientes entre si, observamos aumento da produção de ERO no grupo de pacientes com sepse comparado ao grupo de sepse grave utilizando-se PMA; também houve aumento da

produção de ERO no grupo de sepse comparado ao de choque séptico após estímulo com *S.aureus*. Comparando-se o grupo de choque séptico com o de sepse grave, foi observada produção maior de ERO após estímulos com LPS e *S.aureus* no primeiro grupo.

Há necessidade de aumento no metabolismo celular na sepse, representado pela maior produção das ERO que são essenciais à capacidade bactericida das células polimorfonucleares (BABIOR, 1984; SZEJDA, PARCE et al., 1984). Entretanto são esses produtos do metabolismo do oxigênio que têm papel duplo na sepse: benéficos na erradicação do patógeno, porém responsáveis em parte por danos teciduais, contribuindo para disfunção orgânica (TAYLOR e PIANTADOSI, 1995).

A técnica utilizada no presente estudo para quantificar a produção das ERO em neutrófilos por citometria de fluxo, utilizando DCFH, foi padronizada há duas décadas. Em 1983, BASS e colaboradores (BASS, PARCE et al., 1983) descreveram a técnica sem estímulo e utilizando PMA. Em 1984, em outro artigo, o mesmo grupo relata a produção de ERO durante a fagocitose, utilizando cepas de *S. aureus* marcadas (SZEJDA, PARCE, et al., 1984). Seguindo-se esses achados, surgiram vários outros estudos relacionando sepse e produção de ERO, inclusive com diferentes tipos de estímulos. Assim, TRAUTINGER e colaboradores (TRAUTINGER, HAMMERLE et al., 1991), mostraram que há um aumento significativo na produção de ERO utilizando PMA como estímulo em grupo de pacientes críticos que desenvolveram sepse. Outros estudos também apontam para um aumento no metabolismo oxidativo na sepse. TANJOH (TANJOH, SHIMA et al., 1995) e colaboradores compararam a produção de ERO em três grupos distintos:

pacientes com sepse grave e disfunções orgânicas, pacientes submetidos a grande cirurgia e indivíduos saudáveis. Encontrou-se maior produção de ERO nos dois primeiros grupos.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo, também encontramos aumento significativo do metabolismo oxidativo de neutrófilos de pacientes com sepse grave e choque séptico comparados a indivíduos saudáveis. Quantificamos a produção de ERO basal e após estímulos com PMA, fMLP, LPS e *S. aureus* (MARTINS, KALLAS et al., 2003). Entretanto, existem estudos mostrando diminuição do metabolismo oxidativo na sepse. WENISCH (WENISCH, PARSchALK et al., 1999) e colaboradores demonstraram uma capacidade diminuída dos neutrófilos de pacientes com sepse por gram-negativo em gerar ERO em resposta a estímulo com *E. coli*, corroborando achados anteriores desse mesmo grupo (WENISCH, PARSchALK et al., 1995).

Importantes funções de neutrófilos, como fagocitose e metabolismos oxidativo, tem se mostrado preservadas ou mesmo reguladas positivamente durante a sepse. Estes achados contrastam-se com os de monócitos, que via de regra, apresentam evidências de hipo-resposta na sepse, avaliada pela expressão de HLA-DR e produção de citocinas. Questionamos se tal discrepância seria devido a diferenças na adaptação destas populações celulares na sepse ou refletiriam as diferentes funções avaliadas.

Para tentarmos entender um pouco melhor essa questão e observar se esse fenômeno de tolerância dos monócitos na sepse é universal, ou seja, está presente de uma maneira geral nos mecanismos de ativação, avaliamos o metabolismo oxidativo dessas células.

As primeiras publicações relativas à quantificação do metabolismo oxidativo de monócitos utilizando DCFH mostraram ser um método factível e confiável, embora em todas elas houve separação dos monócitos antes do ensaio de metabolismo oxidativo (BASOE, SMITH et al., 2000; ZELLER, ROTHBERG et al., 1989). Nós utilizamos sangue total por acreditar que dessa forma estaríamos o mais perto possível do que estaria ocorrendo no organismo do paciente séptico, preservando dessa forma inclusive a interação de células e mediadores solúveis, além de eliminar alterações como danos na estrutura celular e estimulação das células pelo processo de separação. Para exemplificar a importância da interação celular, em estudo de Sabroe e colaboradores (SABROE, JONES, et al., 2002), foi demonstrado que a expressão de CD11b em neutrófilos após estímulo com LPS diminuiu significativamente se houver depleção da população de monócitos em comparação aos experimentos com sangue total. Ainda, utilizamos associação de tamanho, granulosidade e expressão de CD14 para diferenciarmos as populações de monócitos e neutrófilos.

Foi observado aumento da produção de ERO em monócitos do conjunto de pacientes em relação ao grupo de voluntários sadios em todas as condições testadas. Quando analisamos os grupos de pacientes em relação ao grupo de sadios, observou-se que a produção de ERO esteve significativamente aumentada em todas as condições testadas no grupo de choque séptico e em quase todas no grupo de sepse, à exceção daquela onde foi utilizado fMLP como estímulo. O grupo de sepse grave teve maior produção de ERO basal e após estímulo com *S. aureus*.

Uma vez analisadas as correlações entre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos, observamos forte associação entre eles (vide figura 17) o que mostra que o estado de ativação dessas duas populações celulares apontam na mesma direção nessa função. Dessa forma, podemos dizer que o fenômeno de tolerância em monócitos pré-estimulados não é universal. Nestes mesmos pacientes, observamos aumento da produção de citocinas inflamatórias na sepse e intensa redução na sepse grave e choque séptico (manuscrito em preparação). Não foram encontrados estudos em que tenha sido analisado o metabolismo oxidativo de monócitos no continuum da sepse.

A análise dos grupos de pacientes entre si também mostra produção maior de ERO em monócitos dos pacientes com sepse e choque séptico em comparação aos pacientes com sepse grave frente a determinados estímulos (LPS e fMLP), semelhante ao que foi encontrado em neutrófilos.

Quando dividimos os grupos por gravidade, isto é, SOFA ≥ 7 e SOFA < 7 , houve produção de ERO significativamente maior em neutrófilos e monócitos de pacientes do grupo de maior gravidade. Além disso foi observada correlação significativa entre produção de ERO após estímulo com fMLP em neutrófilos e monócitos e SOFA, e essa correlação tem aumento praticamente linear com SOFA acima de 7. Também observamos que o grupo com SOFA ≥ 7 é constituído na sua maioria por pacientes com choque séptico (10 em 12 pacientes), assim, podemos inferir que maior produção de ERO (o que estaria refletindo maior ativação) está relacionada a maior desenvolvimento de disfunção de órgãos e/ou vice-versa.

Interessante ressaltar que o metabolismo oxidativo do grupo de sepse e do grupo de SOFA ≥ 7 estão igualmente aumentados em relação ao grupo de SOFA < 7 . Apesar disso, a maior produção de ERO nos pacientes com sepse ocorre na ausência de disfunção de órgãos, ao contrário do que se observou no grupo de SOFA ≥ 7 , que reflete praticamente o grupo de choque séptico. Assim, podemos conjecturar: existe um fator que confere proteção aos pacientes com sepse? De alguma forma as ERO deixam de ter papel nocivo relacionado ao dano tecidual nesses pacientes e só exercem efeito benéfico? A perpetuação do estado inflamatório está associada à disfunção orgânica já que pacientes do grupo de SOFA < 7 apresentam menor estado de ativação, menos disfunção de órgãos ($p < 0,0001$) e menor mortalidade ($p < 0,01$) em relação ao grupo de SOFA ≥ 7 ? Os pacientes do grupo com SOFA ≥ 7 apresentariam algum tipo de resposta satisfatória com o uso de terapêutica anti-inflamatória?

Nesse sentido, também é conveniente destacar que o grupo de pacientes sépticos que apresentou redução de mortalidade com o uso da proteína c ativada no estudo PROWESS foi aquele com maior disfunção orgânica representado pelo APACHE II elevado. Os pacientes com APACHE II menor, portanto com menor disfunção, não se beneficiaram com o uso dessa medicação. Um dos mecanismos supostos para justificar esse benefício nos pacientes mais graves é a diminuição da inflamação que, nesse estudo, foi confirmada pela menor expressão de interleucina 6 (BERNARD, VINCENT, et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que hiperglicemia é responsável por aumento da geração de ERO e o uso de insulina contínua tem efeito de diminuir o metabolismo oxidativo (KYSELOVA, ZOUREK, et al.,

2002). Especula-se que o mecanismo de redução da mortalidade nos pacientes com hiperglicemia decorrente da sepse em uso de insulina contínua possa estar relacionado à menor produção de ERO (VAN DEN BERGHE, 2004).

Mais uma vez, fica evidente que na sepse ainda há controvérsias em relação à sua fisiopatologia e aos resultados de estudos clínicos. E novamente estamos frente a um paradoxo: o metabolismo oxidativo aumentado é uma resposta benéfica do hospedeiro para incrementar a capacidade bactericida dos neutrófilos. Em contrapartida, pode ter efeitos deletérios na circulação, na função enzimática, podendo causar amplificação e perpetuação da resposta inflamatória, com conseqüente disfunção de órgãos e óbito.

A análise de pacientes representando o continuum de manifestações clínicas da sepse mostra-nos que os parâmetros laboratoriais, como produção de espécies reativas de oxigênio, precisam ser interpretados à luz da observação clínica. Da mesma forma, ao ampliarmos a avaliação de monócitos para a produção de espécies reativas de oxigênio demonstramos funcionalmente que uma mesma célula pode ter função reguladas negativamente e positivamente na sepse, conforme já demonstrado por estudos de expressão gênica.

Dessa forma acreditamos que modular a resposta inflamatória e restaurar as funções normais de tecidos e órgãos danificados serão os grandes desafios da terapia intensiva no século 21.

CONCLUSÕES

1. Os resultados encontrados apontam para um maior estado de ativação de neutrófilos no conjunto de pacientes sépticos em comparação aos indivíduos saudáveis conforme pôde ser observado pela maior expressão de CD66b e pela produção de espécies reativas de oxigênio.
2. Houve diminuição da expressão de TLR2 em pacientes com choque séptico e houve tendência da expressão de TLR4 estar diminuída também nesse grupo. Tal achado pode sugerir um fenômeno de readaptação de resposta celular onde determinadas funções possam ter sua atividade regulada negativamente.
3. O metabolismo oxidativo de monócitos em pacientes sépticos encontra-se aumentado em relação aos indivíduos saudáveis. Monócitos são células onde o fenômeno de tolerância já é reconhecido. Entretanto, baseados em nossos achados, pode-se afirmar que tal fenômeno não é universal nessa célula e que determinadas funções, como a produção de espécies reativas de oxigênio, estão preservadas ou até mesmo reguladas positivamente.
4. A utilização do SOFA como preditor de disfunção orgânica foi capaz de discriminar os pacientes entre sobreviventes e não sobreviventes. Houve correlação entre disfunção de órgãos e metabolismo oxidativo de neutrófilos e de monócitos nos pacientes com sepse grave e

choque séptico, embora o metabolismo oxidativo tenha sido maior no grupo de choque séptico. Todavia, o metabolismo oxidativo observado no grupo de pacientes com sepse encontrou-se tão elevado quanto o grupo de choque séptico. Porém, o grupo de sepse não evolui com disfunção orgânica, mostrando que nas fases iniciais da sepse a produção elevada de espécies reativas de oxigênio está relacionada a uma resposta efetiva para resolução do processo infeccioso e em fases mais avançadas parece estar relacionada a maior dano tecidual com conseqüente aumento do número de disfunções e morte. Dessa forma, a produção de espécies reativas de oxigênio no *continuum* da sepse deve ser interpretada à luz da observação clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. **Jama** 263: 937-8, 1990.

ABRAHAM, E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. **Intensive Care Med** 25: 556-66, 1999.

AHMAD-NEJAD, P., HACKER, H., RUTZ, M., BAUER, S., VABULAS, R. M. and WAGNER, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. **Eur J Immunol** 32: 1958-68, 2002.

AKIRA, S. and TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol** 4: 499-511, 2004.

ALBERTI, C., BRUN-BUISSON, C., BURCHARDI, H., MARTIN, C., GOODMAN, S., ARTIGAS, A., SICIGNANO, A., PALAZZO, M., MORENO, R., BOULME, R., LEPAGE, E. and LE GALL, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med** 28: 108-21, 2002.

ANGUS, D. C. and WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med** 29: S109-16, 2001.

AZOULAY, E., ALBERTI, C., LEGENDRE, I., BUISSON, C. B. and LE GALL, J. R. Post-ICU mortality in critically ill infected patients: an international study. **Intensive Care Med** 31: 56-63, 2005.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest** 73: 599-601, 1984.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood** 93: 1464-76, 1999.

BASS, D. A., PARCE, J. W., DECHATELET, L. R., SZEJDA, P., SEEDS, M. C. and THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J Immunol** 130: 1910-7, 1983.

BASSOE, C. F., SMITH, I., SORNES, S., HALSTENSEN, A. and LEHMANN, A. K. Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. **Methods** 21: 203-20, 2000.

BELLINGAN, G. Inflammatory cell activation in sepsis. **Br Med Bull** 55: 12-29, 1999.

BELLINGAN, G. J., CALDWELL, H., HOWIE, S. E., DRANSFIELD, I. and HASLETT, C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. **J Immunol** 157: 2577-85, 1996.

BENJAMIM, C. F., FERREIRA, S. H. and CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis** 182: 214-23, 2000.

BERNARD, G.R., VINCENT J-L., LATERRE, P-F., LAROSA, S.P., DHAINAUT, J-F., LOPEZ-RODRIGUEZ, A., STEINGRUB, J.S., GARBER, G.E., HELTERBRAND, J.D., ELY, E.W., FISHER, C.J. FOR THE RECOMBINANT HUMAN ACTIVATED PROTEIN C WORLDWIDE EVALUATION IN SEVERE SEPSIS (PROWESS) STUDY GROUP. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. **N Engl J Med** 344: 699-709, 2001.

BERNHEIDEN, M., HEINRICH, J. M., MINIGO, G., SCHUTT, C., STELTER, F., FREEMAN, M., GOLENBOCK, D. and JACK, R. S. LBP, CD14, TLR4 and

the murine innate immune response to a peritoneal *Salmonella* infection. **J Endotoxin Res** 7: 447-50, 2001.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol** 40: 845-59, 2004.

BLAIRON, L., WITTEBOLE, X. and LATERRE, P. F. Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. **J Infect Dis** 187: 287-91, 2003.

BOHMER, R. H., TRINKLE, L. S. and STANECK, J. L. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. **Cytometry** 13: 525-31, 1992.

BONE, R. C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. **Crit Care Med** 24: 163-72, 1996.

BOUCHON, A., DIETRICH, J. and COLONNA, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **J Immunol** 164: 4991-5, 2000.

BOUCHON, A., FACCHETTI, F., WEIGAND, M. A. and COLONNA, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. **Nature** 410: 1103-7, 2001.

BRUN-BUISSON, C., DOYON, F. and CARLET, J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. **Am J Respir Crit Care Med** 154: 617-24, 1996.

BRUN-BUISSON, C., DOYON, F., CARLET, J., DELLAMONICA, P., GOUIN, F., LEPOUTRE, A., MERCIER, J. C., OFFENSTADT, G. and REGNIER, B.

Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. **Jama** 274: 968-74, 1995.

BRUNIALTI, M. K., KALLAS, E. G., FREUDENBERG, M., GALANOS, C. and SALOMAO, R. Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood. **Cytometry** 50: 14-8, 2002.

CHISHTI, A. D., SHENTON, B. K., KIRBY, J. A. and BAUDOUIN, S. V. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. **Intensive Care Med** 30: 605-11, 2004.

CONDLIFFE, A. M., KITCHEN, E. and CHILVERS, E. R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **Clin Sci (Lond)** 94: 461-71, 1998.

DROSSOU-AGAKIDOU, V., KANAKOUDI-TSAKALIDOU, F., SARAFIDIS, K., TAPARKOU, A., TZIMOULI, V., TSANDALI, H. and KREMENOPOULOS, G. Administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor to septic neonates induces neutrophilia and enhances the neutrophil respiratory burst and beta2 integrin expression. Results of a randomized controlled trial. **Eur J Pediatr** 157: 583-8, 1998.

ERTEL, W., KREMER, J. P., KENNEY, J., STECKHOLZER, U., JARRAR, D., TRENTZ, O. and SCHILDBERG, F. W. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. **Blood** 85: 1341-7, 1995.

ERTEL, W., KEEL, M., NEIDHARDT, R., STECKHOLZER, U., KREMER, J. P., UNGETHUEM, U. and TRENTZ, O. Inhibition of the defense system stimulating interleukin-12 interferon-gamma pathway during critical illness. **Blood** 89: 1612-20, 1997.

ERTEL, W., KROMBACH, F., KREMER, J. P., JARRAR, D., THIELE, V., EYMANN, J., MUENZING, S., FAIST, E., MESSMER, K. and SCHILDBERG, F. W. Mechanisms of cytokine cascade activation in patients with sepsis: normal cytokine transcription despite reduced CD14 receptor expression. **Surgery** 114: 243-50; discussion 250-1, 1993.

FERREIRA, F. L., BOTA, D. P., BROSS, A., MELOT, C. and VINCENT, J. L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. **Jama** 286: 1754-8, 2001.

FESSLER, M. B., ARNDT, P. G., FRASCH, S. C., LIEBER, J. G., JOHNSON, C. A., MURPHY, R. C., NICK, J. A., BRATTON, D. L., MALCOLM, K. C. and WORTHEN, G. S. Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. **J Biol Chem** 279: 39989-98, 2004.

FEUK-LAGERSTEDT, E., JORDAN, E. T., LEFFLER, H., DAHLGREN, C. and KARLSSON, A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. **J Immunol** 163: 5592-8, 1999.

FREUDENBERG, N., PIOTRASCHKE, J., GALANOS, C., SORG, C., ASKARYAR, F. A., KLOSA, B., USENER, H. U. and FREUDENBERG, M. A. The role of macrophages in the uptake of endotoxin by the mouse liver. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol** 61: 343-9, 1992.

GALANOS, C., FREUDENBERG, M. A., LUDERITZ, O., RIETSCHER, E. T. and WESTPHAL, O. Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. **Prog Clin Biol Res** 29: 321-32, 1979.

GOLDIE, A. S., FEARON, K. C., ROSS, J. A., BARCLAY, G. R., JACKSON, R. E., GRANT, I. S., RAMSAY, G., BLYTH, A. S. and HOWIE, J. C. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. **Jama** 274: 172-7, 1995.

GOSLING, P. The cellular, immune, and metabolic response to trauma. **Crit Rev Clin Lab Sci** 35: 59-112, 1998.

HARTER, L., MICA, L., STOCKER, R., TRENTZ, O. and KEEL, M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. **Shock** 22: 403-9, 2004.

HAYASHI, F., MEANS, T. K. and LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood** 102: 2660-9, 2003.

HAZIOT, A., FERRERO, E., KONTGEN, F., HIJYA, N., YAMAMOTO, S., SILVER, J., STEWART, C. L. and GOYERT, S. M. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. **Immunity** 4: 407-14, 1996.

HIMMELFARB, J., HAKIM, R. M., HOLBROOK, D. G., LEEBER, D. A. and AULT, K. A. Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. **Cytometry** 13: 83-9, 1992.

HONDA, K., YANAI, H., MIZUTANI, T., NEGISHI, H., SHIMADA, N., SUZUKI, N., OHBA, Y., TAKAOKA, A., YEH, W. C. and TANIGUCHI, T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101: 15416-21, 2004.

HOPKINS, P. A. and SRISKANDAN, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. **Clin Exp Immunol** 140: 395-407, 2005.

JACK, R. S., FAN, X., BERNHEIDEN, M., RUNE, G., EHLERS, M., WEBER, A., KIRSCH, G., MENDEL, R., FURLL, B., FREUDENBERG, M., SCHMITZ, G., STELTER, F. and SCHUTT, C. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. **Nature** 389: 742-5, 1997.

JANEWAY, C. A., JR. and MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol** 20: 197-216, 2002.

JIANG, Z., GEORGEL, P., DU, X., SHAMEL, L., SOVATH, S., MUDD, S., HUBER, M., KALIS, C., KECK, S., GALANOS, C., FREUDENBERG, M. and BEUTLER, B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. **Nat Immunol** 6: 565-70, 2005.

JIMENEZ, M. F., WATSON, R. W., PARODO, J., EVANS, D., FOSTER, D., STEINBERG, M., ROTSTEIN, O. D. and MARSHALL, J. C. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. **Arch Surg** 132: 1263-9; discussion 1269-70, 1997.

JUNG, U., RAMOS, C. L., BULLARD, D. C. and LEY, K. Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. **Am J Physiol** 274: H1785-91, 1998.

KANEKO, T., STEARNS-KUROSAWA, D. J., TAYLOR, F., JR., TWIGG, M., OSAKI, K., KINASEWITZ, G. T., PEER, G. and KUROSAWA, S. Reduced neutrophil CD10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with E. coli or lipopolysaccharide. **Shock** 20: 130-7, 2003.

KITCHENS, R. L., THOMPSON, P. A., VIRIYAKOSOL, S., O'KEEFE, G. E. and MUNFORD, R. S. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. **J Clin Invest** 108: 485-93, 2001.

KNAPP, S. and VAN DER POLL, T. Update on CD14, LBP, and Toll-like Receptors in acute infections. **Yearbook of Intensive Care Medicine**. Ed. J-L Vincent, Springer-Verlag; Berlin pp 3-14, 2004.

KNAPP, S., DE VOS, A. F., FLORQUIN, S., GOLENBOCK, D. T. and VAN DER POLL, T. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component

of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. **Infect Immun** 71: 6747-53, 2003.

KNAUS, W. A., DRAPER, E. A., WAGNER, D. P. and ZIMMERMAN, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med** 13: 818-29, 1985.

KNAUS, W. A., SUN, X., NYSTROM, O. and WAGNER, D. P. Evaluation of definitions for sepsis. **Chest** 101: 1656-62, 1992.

KUIJPERS, T. W., VAN DER SCHOOT, C. E., HOOGERWERF, M. and ROOS, D. Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation. **J Immunol** 151: 4934-40, 1993.

KUIJPERS, T. W., HOOGERWERF, M., VAN DER LAAN, L. J., NAGEL, G., VAN DER SCHOOT, C. E., GRUNERT, F. and ROOS, D. CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. **J Cell Biol** 118: 457-66, 1992.

KUIJPERS, T. W., VAN LIER, R. A., HAMANN, D., DE BOER, M., THUNG, L. Y., WEENING, R. S., VERHOEVEN, A. J. and ROOS, D. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. **J Clin Invest** 100: 1725-33, 1997.

KURT-JONES, E. A., MANDELL, L., WHITNEY, C., PADGETT, A., GOSSELIN, K., NEWBURGER, P. E. and FINBERG, R. W. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood** 100: 1860-8, 2002.

KYSELOVA, P., ZOUREK, M., RUSAVY, Z. Hyperinsulinemia and oxidative stress. **Physiol Res** 51: 591-95, 2002.

LANDMANN, R., ZIMMERLI, W., SANSANO, S., LINK, S., HAHN, A., GLAUSER, M. P. and CALANDRA, T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. **J Infect Dis** 171: 639-44, 1995.

LATZ, E., VISINTIN, A., LIEN, E., FITZGERALD, K. A., MONKS, B. G., KURT-JONES, E. A., GOLENBOCK, D. T. and ESPEVIK, T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **J Biol Chem** 277: 47834-43, 2002.

LE GALL, J. R., LEMESHOW, S. and SAULNIER, F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. **Jama** 270: 2957-63, 1993.

LE GALL, J. R., KLAR, J., LEMESHOW, S., SAULNIER, F., ALBERTI, C., ARTIGAS, A. and TERES, D. The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. **Jama** 276: 802-10, 1996.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. and HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell** 86: 973-83, 1996.

LEVY, M. M., FINK, M. P., MARSHALL, J. C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S. M., VINCENT, J. L. and RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med** 31: 1250-6, 2003.

LEY, K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. **Cardiovasc Res** 32: 733-42, 1996.

LINDE-ZWIRBLE, W. T. and ANGUS, D. C. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. **Crit Care** 8: 222-6, 2004.

LIU, S. F., BARNES, P. J. and EVANS, T. W. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo. **Crit Care Med** 25: 512-8, 1997.

LORENZ, E., MIRA, J. P., CORNISH, K. L., ARBOUR, N. C. and SCHWARTZ, D. A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. **Infect Immun** 68: 6398-401, 2000.

LOWRY, S. F. Sepsis and its complications: clinical definitions and therapeutic prospects. **Crit Care Med** 22: S1-2, 1994.

LUNDQVIST, H., FOLLIN, P., KHALFAN, L. and DAHLGREN, C. Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. **J Leukoc Biol** 59: 270-9, 1996.

MARSHALL, J. C. Organ dysfunction as an outcome measure in clinical trials. **Eur J Surg Suppl** 62-7, 1999.

MARSHALL, J. C., COOK, D. J., CHRISTOU, N. V., BERNARD, G. R., SPRUNG, C. L. and SIBBALD, W. J. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. **Crit Care Med** 23: 1638-52, 1995.

MARTINS, P. S., KALLAS, E. G., NETO, M. C., DALBONI, M. A., BLECHER, S. and SALOMAO, R. Upregulation of reactive oxygen species generation and

phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock** 20: 208-12, 2003.

MCCALL, C. E., GROSSO-WILMOTH, L. M., LARUE, K., GUZMAN, R. N. and COUSART, S. L. Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. **J Clin Invest** 91: 853-61, 1993.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol** 1: 135-45, 2001.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. and JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** 388: 394-7, 1997.

MEERSCHAERT, J. and FURIE, M. B. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. **J Immunol** 154: 4099-112, 1995.

MMWR. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 39: 31-4, 1990.

MULLER KOBOLD, A. C., TULLEKEN, J. E., ZIJLSTRA, J. G., SLUITER, W., HERMANS, J., KALLENBERG, C. G. and TERVAERT, J. W. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. **Intensive Care Med** 26: 883-92, 2000.

NAGAI, Y., AKASHI, S., NAGAFUKU, M., OGATA, M., IWAKURA, Y., AKIRA, S., KITAMURA, T., KOSUGI, A., KIMOTO, M. and MIYAKE, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nat Immunol** 3: 667-72, 2002.

NEUFERT, C., PAI, R. K., NOSS, E. H., BERGER, M., BOOM, W. H. and HARDING, C. V. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. **J Immunol** 167: 1542-9, 2001.

NOMURA, F., AKASHI, S., SAKAO, Y., SATO, S., KAWAI, T., MATSUMOTO, M., NAKANISHI, K., KIMOTO, M., MIYAKE, K., TAKEDA, K. and AKIRA, S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. **J Immunol** 164: 3476-9, 2000.

OGURA, Y., BONEN, D. K., INOHARA, N., NICOLAE, D. L., CHEN, F. F., RAMOS, R., BRITTON, H., MORAN, T., KARALIUSKAS, R., DUERR, R. H., ACHKAR, J. P., BRANT, S. R., BAYLESS, T. M., KIRSCHNER, B. S., HANAUER, S. B., NUNEZ, G. and CHO, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature** 411: 603-6, 2001.

OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., FONTENOT, J. D., HAJJAR, A. M., SMITH, K. D., WILSON, C. B., SCHROEDER, L. and ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97: 13766-71, 2000.

PARENT, C. and EICHACKER, P. Q. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. **Infect Dis Clin North Am** 13: 427-47, 1999.

PARK, H. S., JUNG, H. Y., PARK, E. Y., KIM, J., LEE, W. J. and BAE, Y. S. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. **J Immunol** 173: 3589-93, 2004.

PARKER, L., JONES, E., WHYTE, M., DOWER, S. and SABROE, I. Endotoxin tolerance in the human neutrophil. **J Leukoc Biol** (Abstract) 2004.

PERERA, P. Y., MAYADAS, T. N., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., ZAKS-ZILBERMAN, M., GOYERT, S. M. and VOGEL, S. N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. **J Immunol** 166: 574-81, 2001.

PITTET, D., THIEVENT, B., WENZEL, R. P., LI, N., AUCKENTHALER, R. and SUTER, P. M. Bedside prediction of mortality from bacteremic sepsis. A dynamic analysis of ICU patients. **Am J Respir Crit Care Med** 153: 684-93, 1996.

RANGEL-FRAUSTO, M. S., PITTET, D., COSTIGAN, M., HWANG, T., DAVIS, C. S. and WENZEL, R. P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. **Jama** 273: 117-23, 1995.

REMER, K. A., BRCIC, M. and JUNGI, T. W. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immunol Lett** 85: 75-80, 2003.

RIGATO, O. and SALOMAO, R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. **Shock** 19: 113-6, 2003.

RIGATO, O., SILVA, E., KALLAS, E. G., BRUNIALTI, M. K., MARTINS, P. S. and SALOMAO, R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord** 1: 13-30, 2001.

RUSSWURM, S., VICKERS, J., MEIER-HELLMANN, A., SPANGENBERG, P., BREDLE, D., REINHART, K. and LOSCHE, W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. **Shock** 17: 263-8, 2002.

SABROE, I., JONES, E. C., USHER, L. R., WHYTE, M. K. and DOWER, S. K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. **J Immunol** 168: 4701-10, 2002.

SABROE, I., PRINCE, L. R., JONES, E. C., HORSBURGH, M. J., FOSTER, S. J., VOGEL, S. N., DOWER, S. K. and WHYTE, M. K. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. **J Immunol** 170: 5268-75, 2003.

SALOMAO, R., WEY, S. B., PIGNATARI, A. C. and CASTELO FILHO, A. [Epidemiology of bacteremias at a university hospital]. **Rev Assoc Med Bras** 38: 62-6, 1992.

SALOMAO, R., CASTELO FILHO, A., PIGNATARI, A. C. and WEY, S. B. Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. **Rev Paul Med** 111: 456-61, 1993.

SALOMAO, R., RIGATO, O., PIGNATARI, A. C., FREUDENBERG, M. A. and GALANOS, C. Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and therapeutic perspectives. **Infection** 27: 1-11, 1999.

SALVO, I., DE CIAN, W., MUSICCO, M., LANGER, M., PIADENA, R., WOLFLER, A., MONTANI, C. and MAGNI, E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Med** 21 Suppl 2: S244-9, 1995.

SANDS, K. E., BATES, D. W., LANKEN, P. N., GRAMAN, P. S., HIBBERD, P. L., KAHN, K. L., PARSONNET, J., PANZER, R., ORAV, E. J. and SNYDMAN, D. R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. **Jama** 278: 234-40, 1997.

SATO, S., SUGIYAMA, M., YAMAMOTO, M., WATANABE, Y., KAWAI, T., TAKEDA, K. and AKIRA, S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol** 171: 4304-10, 2003.

SCHUMANN, R. R., KIRSCHNING, C. J., UNBEHAUN, A., ABERLE, H. P., KNOPE, H. P., LAMPING, N., ULEVITCH, R. J. and HERRMANN, F. The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. **Mol Cell Biol** 16: 3490-503, 1996.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol** 23: 197-223, 2005.

SHEAGREN, J. Shock syndromes related to sepsis. *Philadelphia/Tokyo* 1584-1588, 1992.

SILVA, E., PEDRO M DE, A., SOGAYAR, A. C., MOHOVIC, T., SILVA, C. L., JANISZEWSKI, M., CAL, R. G., DE SOUSA, E. F., ABE, T. P., DE ANDRADE, J., DE MATOS, J. D., REZENDE, E., ASSUNCAO, M., AVEZUM, A., ROCHA, P. C., DE MATOS, G. F., BENTO, A. M., CORREA, A. D., VIEIRA, P. C. and KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care** 8: R251-60, 2004.

SOOKHAI, S., WANG, J. H., MCCOURT, M., O'CONNELL, D. and REDMOND, H. P. Dopamine induces neutrophil apoptosis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism. **Surgery** 126: 314-22, 1999.

STOCKS, S. C., KERR, M. A., HASLETT, C. and DRANSFIELD, I. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biol** 58: 40-8, 1995.

SZEJDA, P., PARCE, J. W., SEEDS, M. S. and BASS, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **J Immunol** 133: 3303-7, 1984.

TAKEDA, K. and AKIRA, S. Microbial recognition by Toll-like receptors. **J Dermatol Sci** 34: 73-82, 2004.

TAKEUCHI, O., HOSHINO, K. and AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **J Immunol** 165: 5392-6, 2000.

TANJOH, K., SHIMA, A., AIDA, M., TOMITA, R. and KUROSU, Y. Nitric oxide and active oxygen species in severe sepsis and surgically stressed patients. **Surg Today** 25: 774-7, 1995.

TAVARES-MURTA, B. M., MACHADO, J. S., FERREIRA, S. H. and CUNHA, F. Q. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation** 25: 247-53, 2001.

TAVARES-MURTA, B. M., ZAPAROLI, M., FERREIRA, R. B., SILVA-VERGARA, M. L., OLIVEIRA, C. H., MURTA, E. F., FERREIRA, S. H. and CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Crit Care Med** 30: 1056-61, 2002.

TAYLOR, D. E. and PIANTADOSI, C. A. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. **J Crit Care** 10: 122-35, 1995.

TAYLOR, D. E., GHIO, A. J. and PIANTADOSI, C. A. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. **Arch Biochem Biophys** 316: 70-6, 1995.

TILNEY, N. L., BAILEY, G. L. and MORGAN, A. P. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. **Ann Surg** 178: 117-22, 1973.

TOBIAS, P. S., SOLDAU, K. and ULEVITCH, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. **J Exp Med** 164: 777-93, 1986.

TRAN, D. D., GROENEVELD, A. B., VAN DER MEULEN, J., NAUTA, J. J., STRACK VAN SCHIJNDEL, R. J. and THIJIS, L. G. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. **Crit Care Med** 18: 474-9, 1990.

TRAUTINGER, F., HAMMERLE, A. F., POSCHL, G. and MICKSCHE, M. Respiratory burst capability of polymorphonuclear neutrophils and TNF-alpha serum levels in relationship to the development of septic syndrome in critically ill patients. **J Leukoc Biol** 49: 449-54, 1991.

TREVANI, A. S., CHORNY, A., SALAMONE, G., VERMEULEN, M., GAMBERALE, R., SCHETTINI, J., RAIDEN, S. and GEFFNER, J. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. **Eur J Immunol** 33: 3164-74, 2003.

TRINKLE, L. S., WELLHAUSEN, S. R. and MCLEISH, K. R. A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. **Diagn Clin Immunol** 5: 62-8, 1987.

TSCHAIKOWSKY, K., SITTL, R., BRAUN, G. G., HERING, W. and RUGHEIMER, E. Increased fMet-Leu-Phe receptor expression and altered superoxide production of neutrophil granulocytes in septic and posttraumatic patients. **Clin Investig** 72: 18-25, 1993.

UJVARI, S., CASTELO FILHO, A. and SALOMAO, R. Evaluation of epidemiologic aspects and outcome of bloodstream infections observed in 1985/1986 and 1992/1993 in a large teaching hospital of Sao Paulo, Brazil. *Hong Kong Abstract* 22.022: 1996.

UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A., HAJJAR, A. M., STEVENS, A., WILSON, C. B., BASSETTI, M. and ADEREM, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature** 401: 811-5, 1999.

VAN DEN BERGHE, GH. Role of intravenous insulin therapy incritically ill patients. **Endocr Pract** 2: 17-20, 2004.

VARKI, A. Selectin ligands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91: 7390-7, 1994.

VERBON, A., DEKKERS, P. E., TEN HOVE, T., HACK, C. E., PRIBBLE, J. P., TURNER, T., SOUZA, S., AXTELLE, T., HOEK, F. J., VAN DEVENTER, S. J. and VAN DER POLL, T. IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. **J Immunol** 166: 3599-605, 2001.

VINCENT, J. L., BIHARI, D. J., SUTER, P. M., BRUINING, H. A., WHITE, J., NICOLAS-CHANOIN, M. H., WOLFF, M., SPENCER, R. C. and HEMMER, M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. **Jama** 274: 639-44, 1995.

VINCENT, J. L., DE MENDONCA, A., CANTRAINE, F., MORENO, R., TAKALA, J., SUTER, P. M., SPRUNG, C. L., COLARDYN, F. and BLECHER, S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. **Crit Care Med** 26: 1793-800, 1998.

VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J. A. and SEGAL, D. M. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 12156-61, 2001.

VLESSIS, A. A., GOLDMAN, R. K. and TRUNKEY, D. D. New concepts in the pathophysiology of oxygen metabolism during sepsis. **Br J Surg** 82: 870-6, 1995.

WEBER, J. R., FREYER, D., ALEXANDER, C., SCHRODER, N. W., REISS, A., KUSTER, C., PFEIL, D., TUOMANEN, E. I. and SCHUMANN, R. R. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. **Immunity** 19: 269-79, 2003.

WENISCH, C., PARSchALK, P., HASENHUNDL, M., GRIESMACHER, A. and GRANINGER, W. Polymorphonuclear leucocyte dysregulation in patients with gram-negative septicaemia assessed by flow cytometry. **Eur J Clin Invest** 25: 418-24, 1995.

WENISCH, C., PARSchALK, B., PATRUTA, S., BRUSTBAUER, R. and GRANINGER, W. Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. **Infection** 27: 183-6, 1999.

WHEELER, A. P. and BERNARD, G. R. Treating patients with severe sepsis. **N Engl J Med** 340: 207-14, 1999.

WILLIAMS, M. A., WHITE, S. A., MILLER, J. J., TONER, C., WITHINGTON, S., NEWLAND, A. C. and KELSEY, S. M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces activation and restores respiratory burst activity in monocytes from septic patients. **J Infect Dis** 177: 107-15, 1998.

WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P.
and HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and
pathophysiological aspects.

ANEXOS

PROTOCOLO DE INCLUSÃO

Idade > 18 anos ☐ sim ☐ não

Evidência clínica de sepse com foco definido ou suspeito ☐ sim ☐ não

Se sim:

Preenche pelo menos **2** dos critérios abaixo:

Frequência cardíaca > 90 bpm ☐ sim ☐ não

Temperatura > 38° C ou < 36° C ☐ sim ☐ não

Frequência respiratória > 20 ipm ☐ sim ☐ não

Contagem de leucócitos > 10.000 cels/mm³ ou
< 4000 cels/mm³ ou formas imaturas > 10% ☐ sim ☐ não

Se sim:

Dentro de um período de 72 horas ou menos ☐ sim ☐ não

Primeira disfunção há menos de 48 horas ☐ sim ☐ não

Se sim:

Encontra-se presente algum dos critérios de exclusão abaixo:

Doença em estágio terminal como neoplasias ou Aids;

Paciente recebendo terapia experimental com drogas, incluindo proteína C ativada;

Se não

INCLUIR NO PROTOCOLO

- **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

ASSOCIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS À DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS E MORTALIDADE NA SEPSE, SEPSE GRAVE E NO CHOQUE SÉPTICO.

Pesquisadores responsáveis:

Paulo Sérgio Martins

Reinaldo Salomão

Sepse é uma doença conhecida como infecção generalizada causada por microorganismos (bactérias, fungos, vírus), e pode levar o paciente à morte em até 60% dos casos, o que mostra a importância de entendermos melhor os mecanismos que podem causá-la.

Os pacientes que morrem com infecção generalizada (sepsis), na maioria das vezes apresentam falência de muitos órgãos, como os rins, pulmões, cérebro e coração, entre outros. Essa falência de órgãos é conhecida como Disfunção de órgãos.

Existem várias células do corpo humano participando no processo de defesa frente a esses microorganismos invasores. A exemplo há os neutrófilos que são células da primeira linha de defesa, capazes de ingerir bactérias e eliminá-las da circulação. Esse processo de ingestão é conhecido como fagocitose e para torná-lo mais eficaz, isto é, para eliminar as bactérias mais facilmente, os neutrófilos produzem determinadas substâncias conhecidas como radicais de oxigênio. Quando esses neutrófilos têm uma

capacidade aumentada de ingerir bactérias e também estão produzindo muitos radicais de oxigênio, dizemos que estão ativados.

Como todas as células do organismo, os neutrófilos também morrem (são eliminados da circulação) quando estão velhos. A sepse (infecção generalizada) pode fazer com que os neutrófilos morram antes do esperado.

Basicamente, os objetivos desse estudo são:

- 1- Avaliar o quanto os neutrófilos estão ativados na sepse pela medida dos radicais de oxigênio e pela ativação de receptores da superfície dessas células.
- 2- Observar a associação dessa ativação com disfunção de órgãos.

COLETA DE SANGUE: será coletada amostra de 60 mL de sangue em tubo estéril com heparina 5 mL em tubo de EDTA.

RISCOS: os riscos são mínimos e o único procedimento que pode acarretar algum desconforto ao participante é a coleta do sangue. A coleta é feita através de uma agulha que penetra em uma veia do braço. O desconforto pode ser pela dor local da picada e, raramente, pela formação de pequeno hematoma. A coleta será realizada por profissionais experientes.

POTENCIAIS BENEFÍCIOS NA PARTICIPAÇÃO DESTE ESTUDO: Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados desses exames poderão ajudar a compreender os mecanismos que causam a infecção, podendo assim abrir caminho para novos estudos sobre essa

doença, como o organismo humano se defende e por vezes orientar o tratamento.

CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade do paciente a todo o momento.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Paulo Sérgio Martins que pode ser encontrado no Laboratório de Imunologia, cito à rua Pedro de Toledo, 781 15^o andar, pelo telefone 5579-8226 ramal 27, ou no Hospital Santa Marcelina, situado na Rua Santa Marcelina, 177, telefone 6170-6000 ramais 6369 ou 6229.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Pedro de Toledo, 715, 1^o andar, ou pelos telefones 5576-4564, 5571-1062, ou pelo FAX 5539-7162.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no tratamento do paciente nem tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Não há qualquer ônus financeiro para o paciente que participar do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Os dados e o material coletado somente serão utilizados para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ASSOCIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS À DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS E MORTALIDADE NA SEPSE GRAVE E NO CHOQUE SÉPTICO.”

Eu discuti com o Dr Paulo Sérgio Martins sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesa e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____ data ____/____/____

paciente / representante legal

_____ data ____/____/____

testemunha

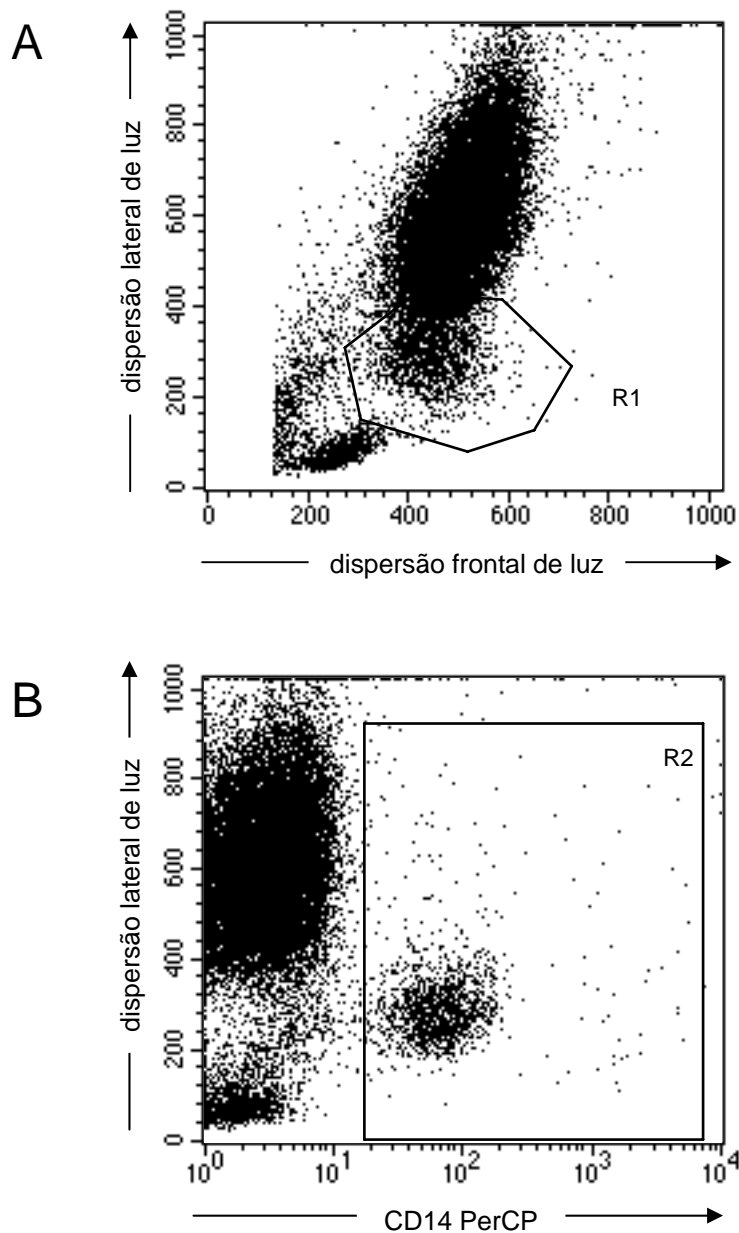


Figura 3: Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total. O gráfico A acima mostra a dispersão frontal de luz (abscissa) e dispersão lateral de luz (ordenada), correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos. O gráfico B abaixo mostra expressão de CD14 (abscissa) e dispersão lateral de luz (ordenada). A região 2 (R2) separa os eventos CD14+. Durante a aquisição foram armazenados 5.000 eventos combinando as regiões R1 e R2.

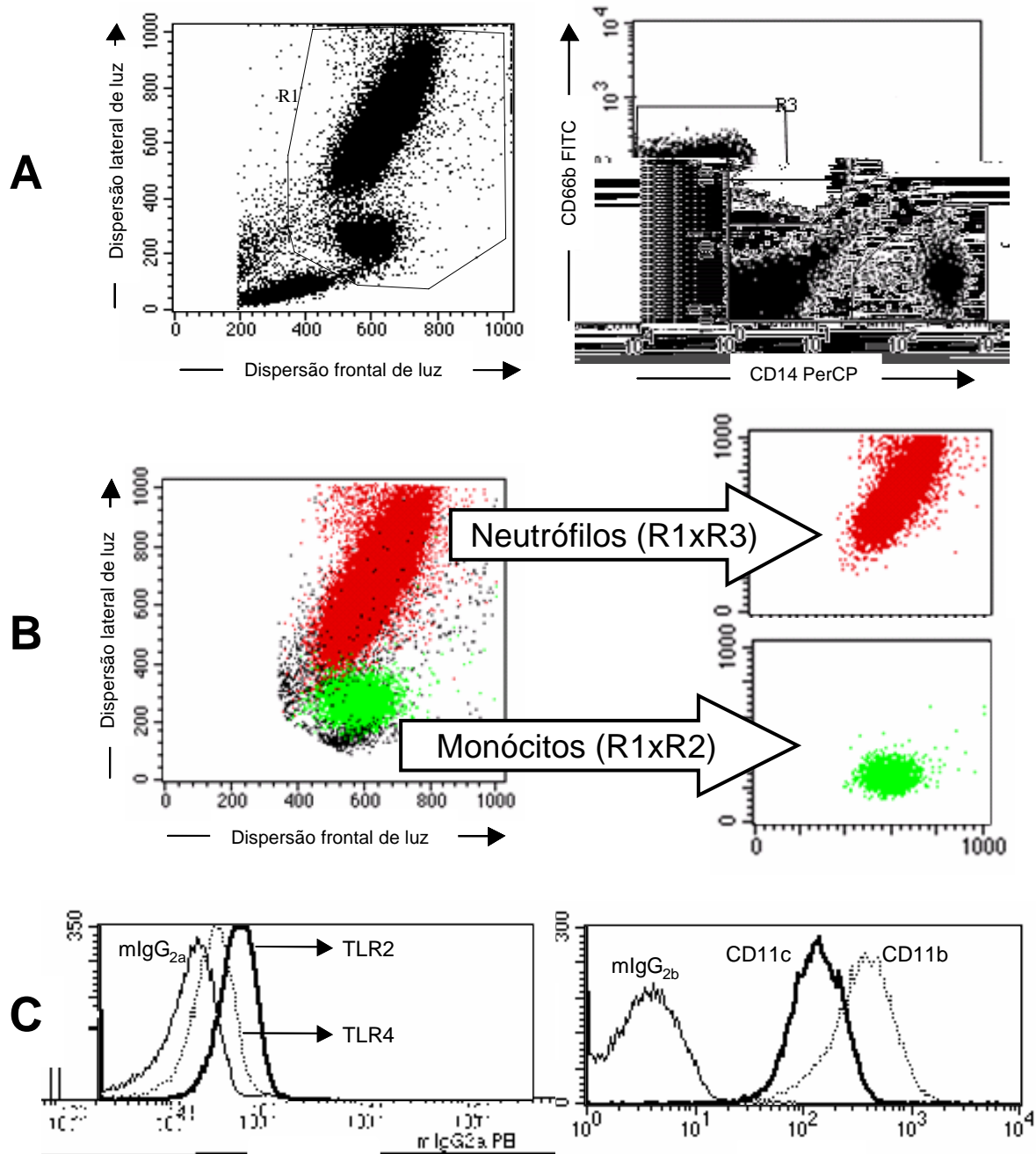


Figura 4: Estratégia de análise de monócitos e neutrófilos em sangue total. **(A)** O gráfico a esquerda mostra a dispersão frontal e lateral de luz, correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos e neutrófilos. O gráfico da direita mostra na região 2 (R2) as células CD14⁺ (monócitos) e a região 3 (R3) mostra as células CD66b⁺ (neutrófilos). **(B)** A estratégia de análise proporciona uma boa definição das populações de monócitos (R1xR2) e neutrófilos (R1xR3). **(C)** Na população de neutrófilos identificados foi analisada a expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b e CD11c através de histogramas. Isotipos controles foram usados em cada situação.

RESUMO

Inflamação é uma resposta fisiológica normal da microcirculação designada para neutralizar, diluir ou destruir o tecido lesado. Uma característica da inflamação é a adesão de leucócitos ao endotélio vascular e a infiltração destes no interstício tissular. A adesão e a infiltração leucocitária dependem de interação com a superfície de células endoteliais, que se dá através de integrinas e moléculas de adesão de células endoteliais (ECAMs). Vão promover o rolamento leucocitário ao longo da superfície das células endoteliais, e adesão firme ao endotélio vascular, facilitando o extravasamento destes para o interstício.

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos irão reconhecer, fagocitar e destruir o agente patogênico. A fagocitose compreende duas etapas: (i) reconhecimento e internalização de microorganismos e; (ii) morte ou neutralização com subsequente digestão do material, envolvendo uma resposta secretória, que inclui um processo denominado “burst” respiratório, o qual consiste na ativação do complexo enzimático NADPH oxidase produzindo ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- e seus metabólitos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) radical hidroxila (OH) e ácido hipocloroso, são essenciais para a morte e digestão de bactérias, fungos e parasitas.

Em trabalho recente, observamos que o metabolismo oxidativo e a capacidade fagocítica dos neutrófilos de pacientes com sepse grave e choque séptico encontram-se significativamente aumentados em comparação aos indivíduos saudáveis, o que denota um maior estado de ativação dessas células. Considerando tais achados, optamos por realizar um estudo com a finalidade de observar a associação do estado de ativação e regulação dos neutrófilos à disfunção de órgãos e mortalidade na sepse, sepse grave e no choque séptico.

Foram arrolados 41 pacientes sendo 14 com sepse, 12 com sepse grave e 15 com choque séptico e 17 indivíduos saudáveis como grupo controle. Realizamos medidas de receptores de superfície de neutrófilos (TLR2, TLR4, CD11b, CD11c e CD66) e também medidas de metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos nas condições basal (sem estímulo), e após estímulo com PMA, fMLP, *S. aureus* e LPS. A disfunção de órgãos nos pacientes com sepse grave e choque séptico foi avaliada pelo SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) e ainda consideramos a mortalidade de 28 dias.

Encontramos menor expressão de TLR2 em pacientes com choque séptico comparados aos demais grupos ($p < 0,05$) e maior expressão de CD66 no grupo de choque

séptico e sepse grave comparados ao grupo de sadios ($p=0,01$ e $p=0,02$). Também encontramos um maior metabolismo oxidativo de monócitos e neutrófilos em todas as condições consideradas ($p<0,001$) comparando os grupos de pacientes e voluntários sadios. Quando analisamos a associação do metabolismo oxidativo com SOFA, encontramos maior metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulado por fMLP e monócitos estimulado por fMLP, *S. aureus* e LPS, em pacientes com SOFA ≥ 7 ($p<0,001$ em todas as condições), sendo este grupo o de maior mortalidade, com risco relativo atribuído de 2,25.

Assim, observamos uma maior ativação de monócitos e neutrófilos na sepse. Há diferenças de adaptação em monócitos e neutrófilos, mas em relação ao metabolismo oxidativo ambas estão positivamente reguladas.